

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

GABRIELA DE OLIVEIRA

**DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE RNA VIRAL DO SARS-
COV-2 NO ESGOTO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS DO *CAMPUS*
DE POÇOS DE CALDAS**

POÇOS DE CALDAS/MG

2024

GABRIELA DE OLIVEIRA

DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS DE RNA VIRAL DO SARS-COV-2 NO ESGOTO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS DO *CAMPUS* DE POÇOS DE CALDAS

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental, pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tratamento de Efluentes.
Orientador: Gunther Brucha.

POÇOS DE CALDAS/MG

2024

Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Campus Poços de Caldas

Oliveira, Gabriela de .

Detecção e quantificação de fragmentos de RNA viral do SARS-CoV-2 no esgoto da Universidade Federal de Alfenas do campus de Poços de Caldas / Gabriela de Oliveira. - Poços de Caldas, MG, 2024.

70 f. : il. -

Orientador(a): Gunther Brucha.

Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia Ambiental) -
Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, MG, 2024.

Bibliografia.

1. COVID-19. 2. Epidemiologia baseada em esgoto. 3. RT-qPCR. 4. SARS-CoV-2 . 5. Vigilância. I. Brucha, Gunther, orient. II. Título.

GABRIELA DE OLIVEIRA

Detecção e quantificação de fragmentos de RNA viral do SARSCoV-2 no esgoto da Universidade Federal de Alfenas do campus de Poços De Caldas

O Presidente da banca examinadora abaixo assina a aprovação da Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência e Engenharia Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tratamento de Efluentes

Aprovada em: 04 de abril de 2024.

Prof. Dr. Gunther Brucha

Presidente da Banca Examinadora

Instituição: Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Rodrigo de Freitas Bueno

Instituição: Universidade Federal do ABC

Prof. Dr. Leonardo Henrique Soares Damasceno

Instituição: Universidade Federal de Alfenas



Documento assinado eletronicamente por **Gunther Brucha, Coordenador do Programa de Pós-graduação Em Ciência e Engenharia Ambiental**, em 19/04/2024, às 15:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1227262** e o código CRC **7A5B89C8**.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, a Deus, por ter me dado forças para permanecer e abençoar essa jornada.

Aos meus pais Edina e Sebastião, pelo incentivo todos os dias, por cada gesto, ligação, mensagem e apoio.

Ao meu noivo José Luiz, por não soltar minha mão nem um segundo durante esses dois anos.

Aos meus familiares e amigos, que acompanharam minha jornada no mestrado.

Ao meu orientador Gunther, por todos os ensinamentos passados.

À minha amiga Jéssica Teixeira, que me ajudou em todos os aspectos possíveis durante o mestrado e não me abandonou por um segundo desde o início, com ajuda integral nas análises e escrita.

À Ana Laura e Daniela, que apareceram durante o desenvolvimento do trabalho, e desde então me auxiliaram nas coletas e análises.

A todos os meus colegas que passaram pelo laboratório durante esse período, Alessandra, Bruna, Bianca, Kátia, Marcos, e outros tantos que contribuíram para o projeto ser desenvolvido.

Aos técnicos da Universidade Federal de Alfenas.

Aos professores Alexandre, Diego e Rafael, que cederam equipamentos e laboratórios para o desenvolvimento das coletas e análises.

Ao professor Rodrigo da UFABC, que desde o início se encontra disposto a ajudar, transmitir ensinamentos e realizar as análises para o trabalho.

Às meninas do laboratório da UFABC, Lívia, Adriana e Grazi, que sempre estiveram disponíveis para responder qualquer dúvida, e contribuíram muito para o presente trabalho.

À REMONAR por toda parceria desde o início.

Às Universidades Federal de Alfenas e Federal do ABC, pela infraestrutura cedida para realização das análises, coletas e por serem locais de tanto aprendizado durante esses anos.

À FAPEMIG pela concessão da bolsa de estudo de Mestrado.

O presente trabalho foi realizado com o apoio de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A COVID-19 resultou em significativos impactos econômicos e um trágico número de óbitos. Durante a pandemia, o Brasil teve uma testagem clínica escassa, e isso favoreceu o agravamento da doença. A Epidemiologia Baseada em Esgoto (EBE) é uma ferramenta que possibilita a detecção do material genético do SARS-CoV-2 fragmentado presente no esgoto, e permite o monitoramento em larga escala da COVID-19. O presente trabalho teve como objetivo detectar e quantificar fragmentos de RNA do SARS-CoV-2, agente causador da COVID-19, no esgoto da Universidade Federal de Alfenas – *campus* Poços de Caldas e buscar uma relação entre a concentração de RNA viral e as características físico-químicas do esgoto. As coletas do esgoto bruto foram realizadas no poço de sucção da elevatória de esgoto da universidade. Juntamente com as análises de biologia molecular realizou-se a caracterização do esgoto através dos parâmetros físico-químicos, incluindo, Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO), Demanda Química de Oxigênio (DQO), pH, série de sólidos, sulfato e fósforo. Esses parâmetros objetivou a caracterização do esgoto para evitar deturpação das amostras, por diluição e outros fatores interferentes. Foi encontrado RNA viral em todas as semanas analisadas, com concentração média de $3,74 \times 10^5$ cópias de RNA/L. A detecção do material genético indica a presença de alunos ou colaboradores positivos para a doença no *campus*. A análise de correlação por Spearman mostrou elevadas correlações entre os parâmetros de esgoto, mostrando que o esgoto em estudo possuiu características semelhantes aos esgotos sanitários encontrados nas cidades, assegurando que as amostras utilizadas não sofreram impactos significativos de diluição entre outros possíveis fatores externos. Especificamente no que diz respeito à correlação com a concentração de RNA viral, os sólidos sedimentáveis apresentaram forte correlação, superior a 0.591.

Palavras-chave: COVID-19; epidemiologia baseada em esgoto; RT-qPCR; SARS-CoV-2; vigilância.

ABSTRACT

COVID-19 has resulted in significant economic impacts and a tragic number of deaths. During the pandemic, Brazil experienced limited clinical testing, which contributed to the exacerbation of the disease. Wastewater-based epidemiology (WBE) is a method that enables the detection of fragmented SARS-CoV-2 genetic material present in wastewater, allowing for large-scale monitoring of COVID-19. This study aimed to detect and quantify RNA fragments of SARS-CoV-2, the causative agent of COVID-19, in the sewage of the Federal University of Alfenas – Poços de Caldas *campus* and to investigate a relationship between the concentration of viral RNA and the physicochemical characteristics of the wastewater. The raw sewage was collected from the suction well of the university's sewage pumping station. Along with molecular biology analyses, sewage was characterized using physical-chemical parameters, including Biochemical Oxygen Demand (BOD), Chemical Oxygen Demand (COD), pH, series of solids, sulfate and phosphorus. These aimed to characterize the sewage to avoid distortion of the samples, due to dilution and other interfering factors. Viral RNA was found in all weeks analyzed, with an average concentration of 3.74×10^5 copies RNA/L. The detection of genetic material indicates the presence of students or employees positive for the disease on *campus*. The Spearman correlation analysis showed high correlations between the sewage parameters, showing that wastewater in this study had similar characteristics to the sanitary sewage found in cities, ensuring that the samples did not suffer significant impacts from dilution among other possible external factors. With regard to the correlation with the concentration of viral RNA, settleable solids showed a strong correlation, greater than 0.591.

Keywords: COVID-19; wastewater-based epidemiology; RT-qPCR; SARS-CoV-2; surveillance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do vírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19.....	17
Figura 2 – Esquema representativo dos testes diagnósticos para a COVID-19	20
Figura 3 – Representação da entrada do vírus na rede de esgoto por meio de um paciente infectado	23
Figura 4 – Disposição dos prédios da universidade e local de coleta	32
Figura 5 – Elevatória de esgoto da UNIFAL.....	32
Figura 6 – Amostrador automático ISCO série 6712 utilizado para realização das coletas....	33
Figura 7 – Disposição da sonda no poço de sucção da elevatória.	34
Figura 8 – Acondicionamento dos frascos para amostragem no interior do amostrador	34
Figura 9 – Esgoto obtido durante doze horas de coleta.....	35
Figura 10 – Amostras enviadas para UFABC.	36
Figura 11 – Fluxograma do tratamento estatístico adotado aos dados experimentais.....	40
Figura 12 – Quantificação da concentração de RNA viral nas semanas epidemiológicas.....	44
Figura 13 – Média móvel de casos em Poços de Caldas e a concentração de RNA viral encontrada na UNIFAL	48
Figura 14 – Diagramas de dispersão dos dados experimentais para análise de linearidade....	52
Figura 15 – <i>Box-plot</i> dos dados experimentais normalizados	54
Figura 16 – Matriz de correlação das variáveis monitoradas no estudo.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentrações de RNA viral encontradas em universidades no mundo.	28
Tabela 2 – Tabela comparativa entre características do esgoto domésticos e obtido em universidades	30
Tabela 3 – Coletas realizadas e respectivas datas.....	33
Tabela 4 – Parâmetros físico-químicos e microbiológicos e respectivas metodologias.....	35
Tabela 5 – Tabela de primers e sondas utilizadas para detecção do SARS-CoV-2	38
Tabela 6 – Resultados da detecção do SARS-CoV-2 na UNIFAL.	43
Tabela 7 – Carga viral dos fragmentos de RNA a partir dos dados estimados de vazão	46
Tabela 8 – Valores obtidos dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados. ..	49
Tabela 9 – Normalidade dos dados experimentais	53

LISTA DE SIGLAS

CLIA	Imunoensaio quimioluminescente
Ct	<i>Cycle threshold</i>
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DQO	Demanda Química de Oxigênio
EBE	Epidemiologia Baseada em Esgoto
ECA2	Enzima Conversora de Angiotensina 2
ECLIA	Imunoensaio por Eletroquimioluminescência
ELISA	Imunoensaio enzimático
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
IQR	Intervalo Interquartil
LFA	Ensaio de Fluxo Lateral
MERS-CoV	Síndrome Respiratória do Oriente Médio
NAAT	Técnicas de Amplificação dos Ácidos Nucleicos
NaCl	Cloreto de Sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Solução Tampão Salina-Fosfato
PEG	Poli(etil)enoglicol
REMONAR	Rede de Monitoramento de COVID-19 em Águas Residuais
RT-LAMP	Loop com Transcriptase Reversa
RT-PCR	Transcrição Reversa Seguida de Reação em Cadeira da Polimerase
SARS-CoV-2	Coronavírus 2 da Síndrome Respiratória Aguda Grave
UFABC	Universidade Federal do ABC
UNIFAL	Universidade Federal de Alfenas
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
WHO	<i>World Health Organization</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca registrada

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	O NOVO CORONAVÍRUS E A COVID-19.....	16
2.2	VIAS DE TRANSMISSÃO DO SARS-CoV-2	18
2.3	MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA O SARS-CoV-2.....	20
2.3.1	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)	21
2.3.2	Ensaio de imun absorção enzimática (ELISA)	21
2.3.3	Ensaio de fluxo lateral (LFA)	22
2.4	SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUAIS	22
2.5	EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS SARS-CoV-2 NO ESGOTO	24
2.6	MONITORAMENTO DO VÍRUS SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUAIS DE UNIVERSIDADES	26
2.7	CARACTERIZAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUAIS	29
3	METODOLOGIA	32
3.1	LOCAL DE AMOSTRAGEM E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS	32
3.2	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	35
3.3	DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO SARS-CoV-2.....	36
3.3.1	Concentração do material genético nas amostras de esgoto	37
3.3.2	Extração do RNA do SARS-CoV-2	37
3.3.3	Detecção e quantificação do SARS-CoV-2	38
3.4	DETERMINAÇÃO DA VAZÃO E CARGA VIRAL	39
3.5	PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO.....	39
3.5.1	Linearidade	40
3.5.2	Normalidade	40
3.5.3	Detecção de outliers	41
3.5.4	Correlação entre as variáveis	41
3.5.5	Software	41
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1	DETECÇÃO DE FRAGMENTOS DO RNA VIRAL	42
4.2	QUANTIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RNA VIRAL	44

4.3	CENÁRIO DA PANDEMIA DA COVID-19 NAS SEMANAS ANALISADAS	47
4.4	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO ESGOTO..	49
4.5	CORRELAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE E A CONCENTRAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RNA VIRAL	52
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	57
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	58
	REFERÊNCIAS.....	59
	APÊNDICE A – Caracterização dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do esgoto.....	68
	ANEXO A – Curva padrão de N1 para quantificação das amostras.....	69
	ANEXO B – Curva padrão de N2 para quantificação das amostras.....	70

1 INTRODUÇÃO

Em dezembro de 2019, houve um reporte à Organização Mundial de Saúde (OMS) sobre casos de pneumonia com origem desconhecida na China. No mês de janeiro de 2020 foi identificado o novo coronavírus, intitulado coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), que causa a COVID-19 em humanos (WHO, 2020). A pandemia da COVID-19 foi decretada pela OMS em março de 2020 e desde essa data a doença acometeu inúmeras vítimas fatais e instabilidades econômicas no mundo (Ciotti *et al.*, 2020).

De forma geral, os sintomas relacionados a COVID-19 não são específicos e são muito semelhantes às infecções causadas por outros vírus. Utku *et al.* (2020), mencionam a tosse como o principal sintoma de pacientes positivos para a doença, seguida de fraqueza, confusão do olfato e paladar, mialgia e febre. Para pacientes já acometidos e negativados, a tosse continua sendo o principal sintoma, seguida de fraqueza, dispneia, dor de cabeça e febre. Além do sistema respiratório, o SARS-CoV-2 pode acometer o sistema nervoso, digestivo e cardiovascular, causando dores de cabeça e peito, diarreia e falta de apetite (Weng; Su; Wang, 2021).

Desde o início da pandemia contabiliza-se mais de sete milhões de óbitos no mundo, sendo sua maioria localizada nas Américas. Em contrapartida esse continente não apresenta maior número de casos no ranking global, que é ocupado pela Europa (WHO, 2024). Ainda de acordo com a *World Health Organization* (WHO, 2024), o Brasil é o segundo País do mundo que apresenta maior quantidade de óbitos devido às complicações da COVID-19, esses são superiores a 700 mil. Em relação ao número de casos constatados, o país se posiciona em sexto lugar no ranking mundial, com mais de 37,5 milhões de casos acumulados desde o início da pandemia, sendo que o primeiro caso ocorreu no dia 25 de fevereiro de 2020, confirmado pelo Ministério da Saúde (Rodriguez-Morales *et al.*, 2020). Essas observações sugerem que ocorreu uma letalidade maior da doença no Brasil, comparando com outros países, ou houve escassez de testes clínicos realizados nesse, dificultando avaliar o cenário real da COVID-19.

Chernicharo *et al.* (2021) afirmam que o Brasil possuía um número pequeno de testagem clínica, e esse fato pode camuflar a quantidade de casos reais em uma determinada comunidade. Isso se atribui à presença de limitações, como, o emprego de testes precisos e disponibilização de materiais necessários para a aplicação de testes, visto que o Brasil depende de importação de diversos insumos (Magno *et al.*, 2020).

Além de testes respiratórios apresentarem positivos para a presença de SARS-CoV-2, Wu *et al.*, (2020), encontraram RNA viral em amostras fecais de 55% dos pacientes positivados

para COVID-19, possivelmente o vírus se mantém nas fezes por até 5 semanas após o resultado negativo da amostra respiratória. Ao associar a ideia de que aproximadamente metade da população infectada pelo novo coronavírus excreta-o nas fezes (Medema *et al.*, 2020a) ao fato de não haver testagem clínica suficiente para monitoramento real da pandemia, a epidemiologia baseada em esgoto (EBE) se tornou uma ferramenta para entender melhor o comportamento da doença na população.

A EBE tem potencial para vigilância de doenças, visto que o esgoto possui uma grande carga de patógenos que são excretados pela população por meio das fezes (Choi *et al.*, 2018). Além disso, se mostra uma ótima ferramenta de alerta precoce da COVID-19, considerando que a eliminação do RNA do SARS-CoV-2 por meio das fezes pode ocorrer antes do início dos sintomas (Zhu *et al.*, 2021). A EBE facilita a logística do sistema de saúde antes que tenha um aumento substancial de casos, por identificar a carga viral excretada por pessoas sintomáticas e assintomáticas, que estão acometidas pelo SARS-CoV-2 e não realizaram o teste clínico (Chernicharo *et al.*, 2021).

Neste cenário, o monitoramento do esgoto para identificar e mensurar o RNA viral do SARS-CoV-2 em ambientes universitários se mostra de vital importância. Por meio de análise do esgoto, é possível implementar um controle mais eficaz das medidas preventivas, reduzindo riscos de surtos dentro do *campus* em estudo. Além disso, considerando que uma universidade constitui uma comunidade de dimensão menor em comparação com uma cidade inteira, a disseminação de informações ocorre de forma mais ágil, promovendo uma maior conscientização dentro da comunidade acadêmica acerca das ações preventivas necessárias. Portanto, este estudo teve como finalidade a detecção e quantificação do SARS-CoV-2 no sistema de esgoto da Universidade Federal de Alfenas, localizada no *campus* Poços de Caldas.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Dentro do escopo dessa pesquisa, os objetivos específicos foram definidos da seguinte forma:

- a) Executar a coleta do esgoto e sua subsequente caracterização, abrangendo análises físico-químicas e microbiológicas;
- b) Calcular a vazão do esgoto nos dias os quais a coleta foi realizada;
- c) Empregar a técnica de RT-qPCR para quantificar as cópias de RNA viral do SARS-CoV-2 encontradas nas amostras de esgoto;
- d) Estabelecer a correlação entre a quantidade de RNA viral e as propriedades físico-

- químicas e microbiológicas identificadas no esgoto;
- e) Elaborar estratégias para intervenção para prevenir potenciais surtos do vírus com base nos dados coletados.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O NOVO CORONAVÍRUS E A COVID-19

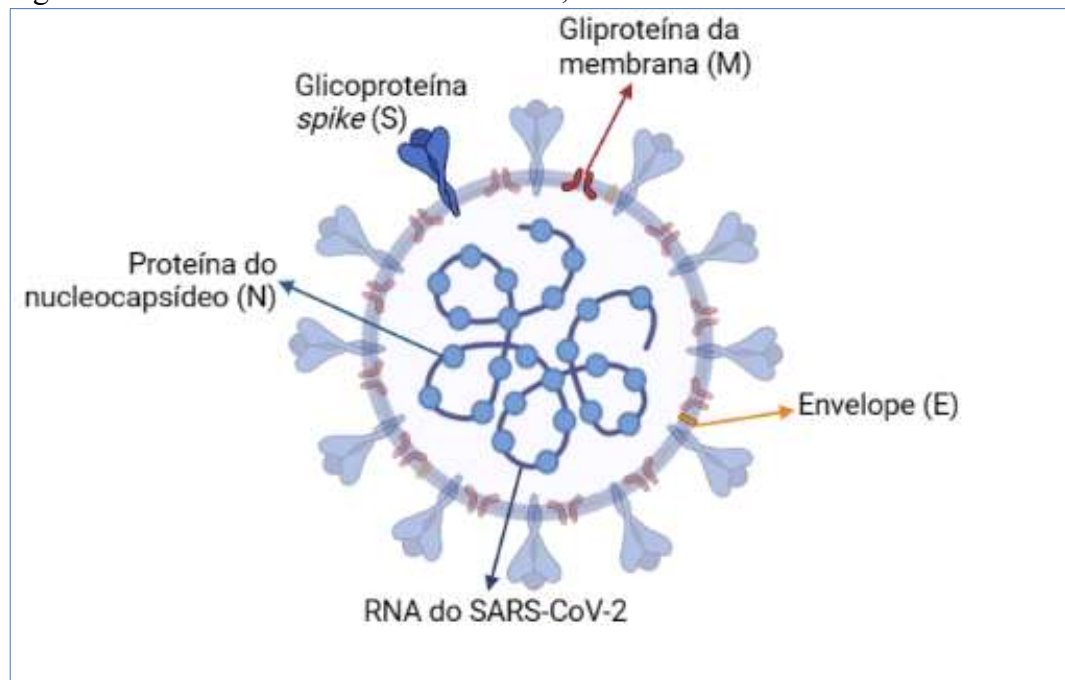
Os coronavírus (CoV) tratam-se de vírus envelopados, moderadamente esféricos e medem em média 120 nm de diâmetro (Lai; Cavanagh, 1997). De acordo com o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV, 2019), pertencem à família Coronaviridae ordem Nidovirales.

Esses vírus podem acometer animais e humanos, e se caracterizam por causar surtos, como já observado nos anos de 2003 e 2015/2016, os quais causaram a síndrome respiratória aguda grave (SARS), e de 2012 a 2017 com a síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) (Kasmi *et al.*, 2020). Ao considerar que os dois principais grandes surtos de doenças causadas por um coronavírus se iniciou na China, Fan *et al.* (2019), afirmam que há uma proximidade muito grande entre os humanos e morcegos (hospedeiros primários do vírus) nesse país, além disso, a cultura chinesa sustenta a ideia de que se alimentar de animais recém-abatidos é nutricionalmente melhor, aumentando as chances de transmissão viral.

O SARS-CoV-2 é o sétimo vírus do tipo coronavírus capaz de infectar humanos. Pertencem ao gênero *Betacoronavirus*, o qual estão presentes o vírus da SARS-CoV e MERS-CoV (KO *et al.*, 2020). Apresentam fita simples não segmentada, tendo seu genoma variando de 26 a 32 kb (ABULSOUD *et al.*, 2023). A estrutura do SARS-CoV-2 consiste na glicoproteína da membrana viral (M), glicoproteína *spike* (S), e o envelope (E) que está anexo à bicamada lipídica envolvendo o nucleocapsídeo helicoidal (N), onde está o RNA viral, conforme mostra a Figura 1 (Kumar *et al.*, 2020).

O novo coronavírus, assim como os demais, é um vírus zoonótico. Acredita-se que o primeiro contato humano com o SARS-CoV-2 pode ter sido por meio do consumo de animais comprados em uma feira regional em 2019 na China, rapidamente ocorreu transmissão entre humanos e iniciou o surto da COVID-19 no mundo (Shereen *et al.*, 2020). Para conter a propagação do vírus foram tomadas medidas como a utilização de máscaras, distanciamento social e utilização de sabonetes e álcool 70% nas mãos (Abulsoud *et al.*, 2023).

Figura 1 – Estrutura do vírus SARS-CoV-2, causador da COVID-19



Fonte: Adaptado de Kumar *et al.* (2020). Criado por BioRender

Mesmo com a tomada de medidas cabíveis pelos países, a COVID-19 causou inúmeros óbitos no mundo, contabilizando mais de sete milhões de óbitos (WHO, 2024). A letalidade da doença se difere em cada área. Enquanto a maior parte da população não apresentou sintomas, cerca de 2% dessa foram acometidas pelo SARS-CoV-2 e apresentaram sintomas graves (Shereen *et al.*, 2020), como, pneumonia, falência dos órgãos, resultando em óbitos.

Vale enfatizar que a forma como o vírus afeta o ser humano é dependente de alguns fatores, sendo eles, idade, grupo sanguíneo, taxa de sedimentação dos glóbulos vermelhos, sendo que a gravidade da COVID-19 pode ser indicada pela quantidade de linfócitos, hemoglobina e ferritina (Abulsoud *et al.*, 2023).

O SARS-CoV-2 entra nas células humanas utilizando-se da glicoproteína *spike* (S), presente na superfície externa do vírus, que por meio da interação do seu subdomínio chamado domínio de ligação do receptor (RBD) e do receptor humano, a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2) (Kumar *et al.*, 2020).

As variantes que apareceram no decorrer da pandemia apresentaram mutações principalmente na glicoproteína S, podendo influenciar, portanto, na transmissibilidade da doença. Pode-se citar a ocorrência de aproximadamente 28 mil mutações no SARS-CoV-2. Dentre as variantes existentes, as mais preocupantes, como denominadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), são as variantes Alfa, Beta, Gama, Delta e Omicron, cada uma surgiu em uma parte do mundo, e se disseminou rapidamente por todos os países (Abulsoud *et al.*,

2023), as três primeiras são responsáveis pela terceira onda de COVID-19, a variante Delta foi responsável pela quarta, e a quinta ocorreu devido à ação da variante Omicron e suas sublinhagens, essa última se tornou predominante no mundo em poucos dias (Cocherie *et al.*, 2022).

A mutação viral diminui a resposta imunológica e aumenta a possibilidade de reinfeção, interferindo, portanto, na eficácia das vacinas monovalentes existentes, que promovem a ação de anticorpos neutralizantes inviabilizando a ligação da proteína S com as células humanas, e assim diminui a disseminação da doença e os sintomas graves causados pelo SARS-CoV-2 (Abulsoud *et al.*, 2023).

Para aumentar a eficiência da imunização, visto que foi diminuída devido ao surgimento das novas variantes, no dia 22 de novembro de 2022 foi aprovado o uso emergencial da vacina Comirnaty Bivalente Pfizer (Brasil, 2022). Essa é caracterizada pela utilização do RNA mensageiro (mRNA) que codifica a proteína S da cepa original do SARS-CoV-2 e da variante Omicron e algumas de suas sublinhagens. Administra-se apenas uma dose da vacina para indivíduos vacinados a mais de dois meses pela vacina monovalente (Hause *et al.*, 2022).

2.2 VIAS DE TRANSMISSÃO DO SARS-CoV-2

A COVID-19 é uma doença que se disseminou rapidamente em todo mundo, culminando na pandemia que perdurou de 2020 a 2023. O vírus é de fácil transmissão e possui diversas vias para acometer as pessoas. Tanto pacientes sintomáticos quanto assintomáticos transmitem a COVID-19. Um estudo observou que os dois tipos de pacientes contribuem de forma semelhante para a transmissão e disseminação do SARS-CoV-2, portanto é preciso tomar devidas medidas preventivas levando em consideração a transmissão assintomática, afim de conter surtos (Chowdhury *et al.*, 2022).

Dentre as vias de transmissões possíveis da COVID-19, a principal é humano-humano, por meio das secreções respiratórias no ar. A transmissão aérea da COVID-19 principalmente em ambientes fechados é um grande problema, pois a concentração de aerossóis aumenta e conseqüentemente disseminação do SARS-CoV-2 é maior. Por isso é importante manter o distanciamento social, utilizar máscaras e desinfetar superfícies em lugares lotados (Noorimotlagh *et al.*, 2021).

A partir do aglomerado de vírus (viruletos) ejetados pela tosse ou espirro, Basak, Mitra e Bandyopadhyay (2022) avaliaram a trajetória desses, e de acordo com seu diâmetro, constatou-se que, o aglomerado de vírus com diâmetros maiores (300-500 μ m) não conseguia

se locomover por altas distâncias horizontais, porém viruletos menores (1-50 μ m), em 5s conseguiram atingir distâncias superiores a 5m. Por isso, o distanciamento social de 2 metros prescritos por autoridades de saúde não seria suficiente para proteger da COVID-19.

A transmissão via água-humano também é citada na literatura. Um estudo analisou a transmissão por meio de águas poluídas na Índia, observou-se o aumento expressivo de casos em épocas de enchentes e rituais religiosos no país, período que as pessoas tomam banho nas águas do Rio Ganges. A transmissão via água-humano é um alerta para a ocorrência de surtos, visto que nessa situação não se tomam medidas de higiene para reduzir as taxas de infecção, além disso, o nitrito e nitrato presente em demasia no rio Ganges, pode acelerar a infecção pelo SARS-CoV-2 e a mutação viral (Huang *et al.*, 2022).

Relacionada à transmissão da COVID-19 via alimentos, mostra-se que a carne e o leite são alimentos de origem animal e apresentam características que favorecem a sobrevivência do SARS-CoV-2, por isso é importante realizar o devido tratamento térmico nesses produtos como cozimento e pasteurização, respectivamente, garantindo a segurança alimentar. Os vegetais e frutas podem ser contaminados pelo SARS-CoV-2 e transmitir principalmente no momento de irrigação com a utilização de água residual. Todos os outros alimentos podem sofrer contaminação cruzada a partir da manipulação e infectar indiretamente os consumidores (Abbasi *et al.*, 2022).

Um estudo realizado por Ning *et al.* (2022), determinou a possibilidade da transmissão via fecal-oral do SARS-CoV-2, pela verificação de alguns fatores como a sobrevivência desse após a passagem pelo ácido gástrico, indicando a possível resistência do vírus nessa etapa. Também foi possível verificar a presença do vírus nas fezes de pacientes acometidos pelo SARS-CoV-2, e sobrevivência desse por dois dias, porém ressalta a necessidade de estudos mais profundos sobre essa rota de transmissão.

Da mesma forma, não há estudos até o momento que comprovem a transmissão da COVID-19 por esgoto. Pesquisas apontaram que não há infectividade do vírus em efluentes. Vírus ativos precisam de uma célula hospedeira para se manterem vivos, já os fragmentos do seu RNA são encontrados corriqueiramente nas águas residuais. Dessa forma, ao detectar RNA viral nas águas residuais, não indica que o vírus está em sua forma ativa e provavelmente são amplificados os fragmentos de RNA do SARS-CoV-2 (Gogoi *et al.*, 2024).

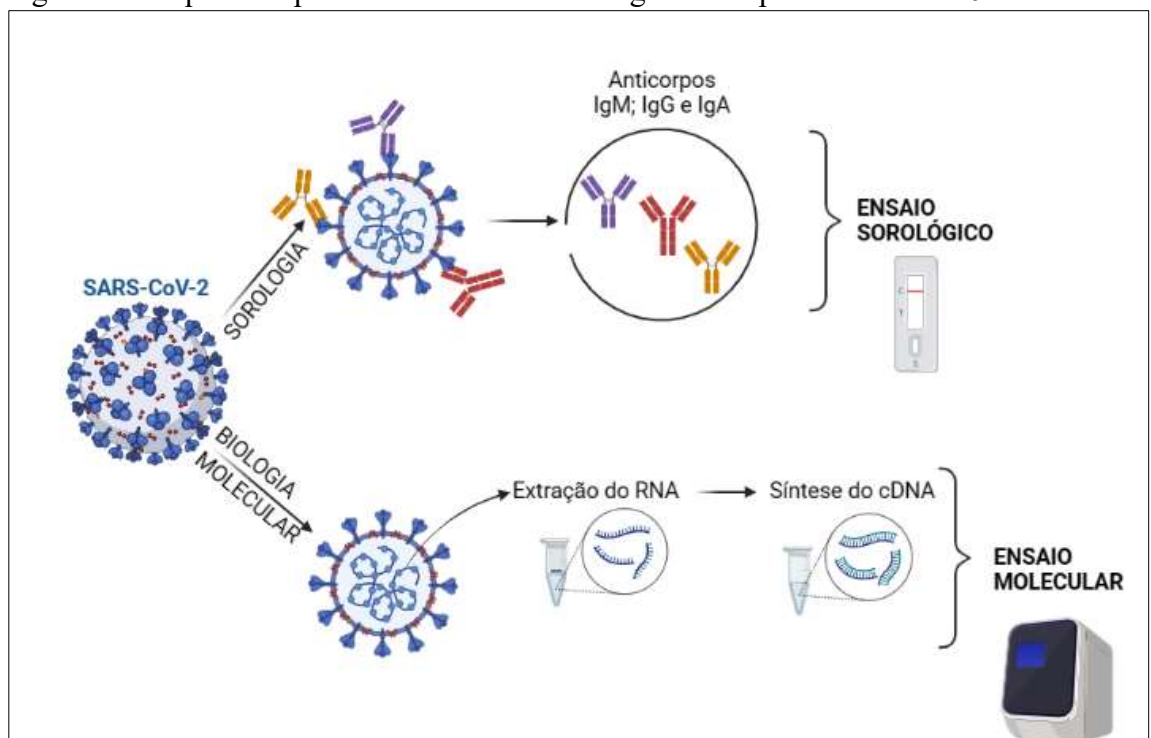
Outra via de transmissão é a materno-fetal, que é rara. Um estudo realizado por Iacob *et al.* (2022) mostrou que a transmissão vertical de SARS-CoV-2 da mãe para o recém-nascido ocorreu em 1,06% dos casos.

2.3 MÉTODOS DIAGNÓSTICOS PARA O SARS-CoV-2

O Ministério da Saúde apresenta três tipos de diagnósticos para detectar a COVID-19, sendo, o clínico, laboratorial e por imagem. O diagnóstico clínico inicial é dado pela síndrome gripal, considerando o contato direto com pessoas positivas nos quatorze dias anteriores. O diagnóstico laboratorial envolve a biologia molecular, utilizando a transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) e a amplificação isotérmica mediada por loop com transcriptase reversa (RT-LAMP). Abrange também a sorologia, com o ensaio de imun absorção enzimática (ELISA), imunoenensaio por quimioluminescência (CLIA) e imunoenensaio por eletroquimioluminescência (ECLIA). Compreende também os testes rápidos, que incluem o de antígeno e anticorpo. Por fim, o diagnóstico por imagem é realizado pela tomografia computadorizada de alta resolução (Brasil, 2023).

Com o intuito de realizar a detecção do SARS-CoV-2 em pessoas durante a pandemia, foram autorizados pela *Food and Drug Administration* (FDA) a utilização de inúmeros testes laboratoriais, que se dividem basicamente em testes sorológicos e moleculares, Figura 2. O primeiro possui o intuito de verificar a presença dos anticorpos, identificando se a pessoa já foi acometida pelo SARS-CoV-2. O segundo é capaz de identificar a doença em sua fase ativa a partir da detecção de ácido nucleico do vírus (Mansourabadi *et al.*, 2021).

Figura 2 – Esquema representativo dos testes diagnósticos para a COVID-19



Fonte: Adaptado de Mansourabadi *et al.* (2021). Criado por BioRender

Em relação aos diagnósticos laboratoriais para a COVID-19, a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*) (WHO, 2020) recomenda a preferência por testes que envolve a amplificação do ácido nucleico (NAAT) para detecção do gene do SARS-CoV-2, por se tratar de ensaios mais confiáveis. Porém, não exclui a utilização de testes rápidos, também conhecido como teste do antígeno, normalmente esses são desenvolvidos utilizando o ensaio de fluxo lateral (LFA), e não é um método com grande sensibilidade comparando-o com o NAAT, o teste rápido tem resultados em 15 a 30 minutos. A OMS não recomenda a realização de testes qualitativos de anticorpos para diagnosticar a fase aguda da COVID-19, sendo que esses confirmam a resposta do paciente após o acometimento pelo SARS-CoV-2.

O RT-qPCR, ELISA e LFA são metodologias que ocorrem frequentemente para a detecção do SARS-CoV-2 em amostras e estão descritas a seguir.

2.3.1 Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR)

O ensaio de RT-PCR é reconhecido como o ensaio padrão para COVID-19. A partir da detecção do gene alvo do RNA, consegue detectar a presença do vírus da amostra. Os genes alvos utilizados são diversos, dependendo do fabricante dos kits, visando uma ou mais regiões gênicas. Normalmente a detecção e início da amplificação do SARS-CoV-2 é obtida pelo limiar do ciclo (*Cycle threshold* - Ct), que se refere à quantidade de ciclos necessários para emissão de um sinal fluorescente que ultrapassa a linha limite (*threshold*). Quando o número de ciclos for menor que 40, considera a amostra positiva para o vírus, sendo assim, o valor de Ct é inversamente proporcional à carga viral (Sethuraman; Jeremiah; Ryo, 2020).

O ensaio do RT-PCR consiste na amostragem de excretas humanas, como, saliva, fezes, urina, posteriormente ocorre a extração do RNA dessas amostras, transcrição reversa do RNA em DNA complementar (cDNA), que sofre amplificação e quantificação. Essa metodologia é bastante precisa, devido sua alta sensibilidade (Machado *et al.*, 2020).

2.3.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA)

O ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA) é um teste sorológico, que ocorre a partir da interação antígeno/anticorpo. Ele pode identificar os anticorpos ou os antígenos presentes nas amostras, dependendo do teste a ser aplicado. Existem os testes, direto, indireto, sanduíche e competitivo, cada um deles possui uma metodologia diferente, consistindo basicamente na utilização de antígenos, sendo esses do paciente ou sintetizados, anticorpos de

captura e anticorpos de detecção marcado com uma enzima, que na presença de substrato muda a cor do meio. O resultado é observado pela alteração da cor (Xu *et al.*, 2022).

O ELISA é um ensaio barato e fácil de se realizar, e define, na maioria das vezes, a taxa de anticorpos (IgA, IgM e IgG) produzidos a partir do acometimento pelo SARS-CoV-2, sendo determinados como bons biomarcadores da COVID-19. Esse método pode ser utilizado para auxiliar e complementar outros testes, já que obtém uma sensibilidade muito alta após 21 dias do início dos sintomas (Roy *et al.*, 2020).

2.3.3 Ensaio de fluxo lateral (LFA)

O ensaio de fluxo lateral (LFA) é o mais comum para de detecção do SARS-CoV-2 em unidades de atendimentos. Quando se compara a complexidade do ensaio com o RT-qPCR e ELISA, o LFA se mostra bastante simples e rápido, sem a necessidade de qualificação para realizá-lo. O LFA permite a efetivação de ações para conter a doença e garantir a saúde do paciente (Soh; Chan; Ying, 2020).

O objeto em que se realiza o LFA contém duas linhas, teste e controle, e o poço onde é adicionado o material do paciente. O princípio do teste se baseia na ligação do antígeno com o anticorpo, onde o paciente fornece a amostra, que se liga a um anticorpo específico marcado com nanopartículas de ouro, em seguida é imobilizada por um anticorpo na linha de teste, os anticorpos específicos marcados com ouro que sobram na reação, vão para linha de controle, onde são imobilizados. Portanto, quando o paciente está positivado, duas linhas aparecem, caso contrário, apenas uma é expressa na linha de controle (Yüce; Filiztekin; Özkaya, 2021).

2.4 SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUAIS

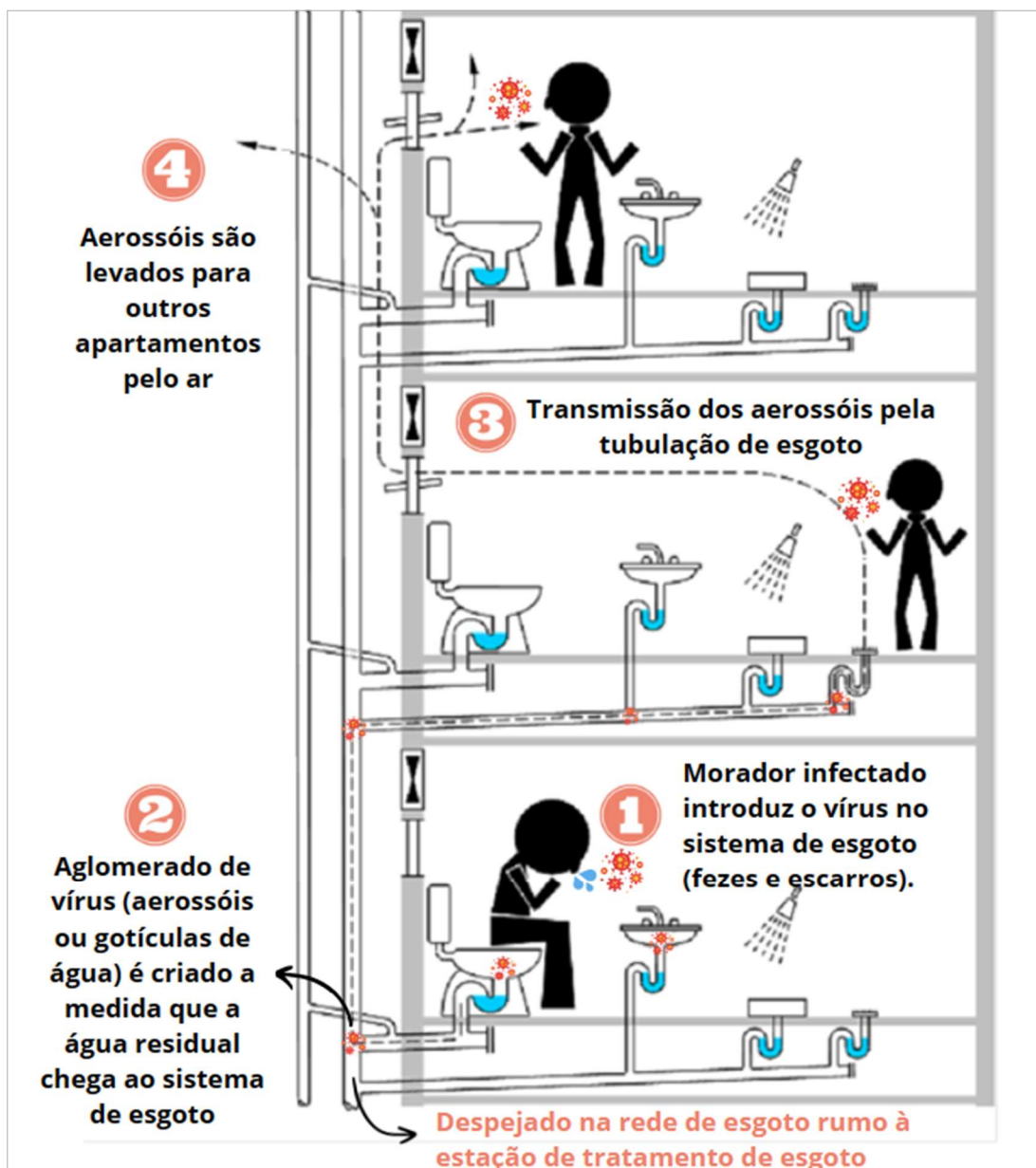
Existem inúmeras formas do vírus da COVID-19, o SARS-CoV-2, adentrar no sistema de esgoto, Figura 3, sendo essas, por meio do vômito, expectoração, higienização das mãos, urina, e principalmente pelas fezes, que pode ser identificada em pacientes com ou sem sintomas da doença, até mesmo, após o resultado negativo em esfregaços da garganta e urina (Gogoi *et al.*, 2024).

Alguns estudos mostraram a presença do material genético do SARS-CoV-2 nos efluentes. Larosa e seus colaboradores *et al.* (2020) encontraram RNA viral em 50% das amostras obtidas do aflente de ETEs na Itália. Da mesma forma ocorreu na República Tcheca, onde verificaram que 11,6% das amostras coletadas de águas residuais não tratadas foram

positivas para o RNA do SARS-CoV-2 (Mlejnkova *et al.*, 2020).

Outro estudo realizado por Hasan *et al.* (2021), verificou a presença do material genético do novo coronavírus em 100% dos afluentes nas ETEs analisadas, em contrapartida, nenhum efluente tratado pela ETE apresentou concentração do vírus, indicando a eliminação do RNA viral ou fragmentos desse. A etapa de desinfecção se mostrou muito eficiente para a eliminação dos fragmentos de RNA do vírus, essa pode ocorrer pela utilização de cloro, etanol, formaldeído, altas temperaturas e radiação ultravioleta (Tiwari *et al.*, 2021).

Figura 3 – Representação da entrada do vírus na rede de esgoto por meio de um paciente infectado



Fonte: Adaptado de Tran *et al.* (2021).

2.5 EPIDEMIOLOGIA DO VÍRUS SARS-CoV-2 NO ESGOTO

O esgoto é uma matriz complexa, com uma extensa quantidade de marcadores físicos e químicos, por meio dele é possível extrair informações importantes sobre uma população, suas atividades, saúde, características e hábitos (Choi *et al.*, 2018).

O monitoramento por meio do esgoto foi e continua sendo muito utilizado para investigar a utilização de drogas e álcool em uma determinada população. Constitui-se uma ferramenta barata e esclarecedora em diversas áreas, como, exposição de poluentes e ocorrência de doenças (Lorenzo; Picó, 2019). A epidemiologia baseada em esgoto foi utilizada para acompanhar patógenos da família *Picornaviridae*, como o poliovírus, causador da poliomielite (Kilaru, *et al.*, 2022). Pioneiramente, por meio do monitoramento de águas residuais, em 1939, foi identificado pela primeira vez o poliovírus em efluentes na cidade de Charleston, Carolina do Sul (Paul; Trask, Gard, 1940). Ao considerar a excreção de pacientes sintomáticos e assintomáticos, a poliomielite continuou sendo monitorada de forma proativa por muitos anos. Realizou-se intervenções e medidas de saúde pública a partir da vigilância de efluentes por meio da EBE, essa foi uma ferramenta essencial para a erradicação do poliovírus (Asghar *et al.*, 2014).

É importante destacar que esse método não se caracteriza como substituto dos testes clínicos para detecção de doenças, porém pode auxiliar nesse quesito, de forma a ser uma alternativa para realização de testagem em larga escala, principalmente em locais onde não se tem acesso recorrente a testes clínicos (Hart; Halden, 2020).

Ao encontrar fragmentos de RNA viral do SARS-CoV-2 em esgoto, surge a possibilidade de monitorar a concentração do seu material genético através de efluentes, empregando a epidemiologia baseada em esgoto. A EBE pode ser utilizada, portanto, como teste complementar, ao determinar a presença e concentração do RNA do SARS-CoV-2 pode-se indicar a tendência de infecção da doença na população (Bibby *et al.*, 2021).

Fragmentos do material genético do SARS-CoV-2 foi detectado em novembro de 2019 em Florianópolis, a partir do monitoramento do esgoto na cidade, tal resultado indicou a possível presença do RNA viral três meses antes (novembro de 2019) do vírus de fato ser confirmado e oficializado via testes clínicos no Brasil (Fongaro *et al.*, 2021). O mesmo ocorreu com o experimento de Medema e seus colaboradores (2020b), o qual verificou e descreveu pela primeira vez, resultados positivos para o RNA do SARS-CoV-2 em águas residuais, especificamente na região gênica N3, seis dias antes de confirmar oficialmente o primeiro caso na cidade de Amersfoort, na Holanda. Portanto, a partir do monitoramento do esgoto é possível

identificar precocemente o surto da doença e criar estratégias para que retarde a propagação dessa, visto que o RNA viral pode estar presente nas águas residuais antes da testagem clínica positiva (Giglio *et al.*, 2021).

Um estudo realizado no sul da Itália identificou a partir do monitoramento das águas residuais, que o SARS-CoV-2 foi detectado concomitantemente aos casos positivos relatados nos municípios objetos da pesquisa, sendo possível identificar uma relação direta entre a presença do RNA de SARS-CoV-2 no esgoto e os casos positivos para a doença COVID-19 (Giglio *et al.*, 2021). Chernicharo *et al.* (2021) afirmam que os casos estimados pelo monitoramento do esgoto seguem a mesma tendência que os relatados pelos boletins epidemiológicos, porém em uma proporção mais elevada. Além disso, o monitoramento para o SARS-CoV-2 em esgoto, concorda com o avanço no plano de vacinação dos cidadãos, diminuindo o RNA viral conforme aumenta a quantidade de pessoas imunizadas (Mendes *et al.*, 2022). Claro e seus colaboradores (2021) identificaram uma forte correlação entre a concentração de RNA viral encontrado no esgoto e dados clínicos para a região do ABC Paulista, São Paulo, enfatizando que os picos das concentrações antecederiam os picos de casos clínicos em aproximadamente duas semanas. Logo, o monitoramento a partir das águas residuais se mostra uma ferramenta econômica e eficiente quando se busca analisar o comportamento e a prevalência do vírus em uma comunidade (Gibas *et al.*, 2021).

No Brasil, o esgoto foi e continua sendo monitorado para SARS-CoV-2 nas capitais brasileiras com o apoio do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT), ETEs Sustentáveis, pela Rede Covid Esgotos. Dentre as capitais monitoradas estão: Belo Horizonte, Curitiba, Fortaleza, Recife, Rio de Janeiro e Distrito Federal. O principal objetivo da rede foi expandir informações acerca do monitoramento realizado, a fim de contribuir na tomada de medidas preventivas pelos órgãos de saúde. Foram divulgados boletins de acompanhamento, os quais apresentaram dados relevantes sobre a tendência temporal das concentrações virais, atuando como um alerta precoce e contribuindo para tomada de decisões eficiente da administração pública. Os boletins foram publicados a cada quinze dias ou um mês, dependendo da gravidade dos dados. Além desses, a rede realizou a alimentação do *dashboard*, contendo informações sobre as concentrações de RNA encontrada em cada ponto amostrado e os indicadores de saúde do município estudado, como, casos confirmados, vacinação e leitos de Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e enfermaria (INCT, 2024).

Apesar de ser uma excelente ferramenta para acompanhamento da COVID-19, existem limitações que podem se tornar obstáculos para que ocorra uma estimativa efetiva da população infectada a partir da carga viral de SARS-CoV-2, como, a quantidade de carga viral excretada

pelo paciente. Li e seus colaboradores (2022) apresentam a possibilidade da excreção de RNA viral por escarro no esgoto, por se tratar de um produto diretamente relacionado ao sistema respiratório, pode concentrar carga viral em até 6 ordens de grandeza maiores que as fezes. A vigilância pelas águas residuais depende de características individuais de excreção, da gravidade e do período de infecção (Karthikeyan *et al.*, 2021). Outros fatores que podem interferir no monitoramento do SARS-CoV-2 em águas residuais seriam as características físico-químicas e microbiológicas do efluente, visto que esse pode promover altas degradações do RNA viral, diminuindo sua concentração no meio (Mendes *et al.*, 2022).

Mesmo que o RNA viral seja encontrado em diversas concentrações e configurações, por exemplo, ele pode não ser excretado por pessoas que estão acometidas pela COVID-19 ou pode ser excretado por pessoas que já tiveram a doença e se encontram com teste clínico negativo, quando se alia a EBE a testagem clínica, torna-se possível a compreensão do comportamento do vírus de forma completa e clara, podendo auxiliar na tomada de medidas para contenção da doença (Betancourt *et al.*, 2021).

2.6 MONITORAMENTO DO VÍRUS SARS-CoV-2 EM ÁGUAS RESIDUAIS DE UNIVERSIDADES

O monitoramento nos efluentes para detecção do RNA viral do SARS-CoV-2 foi uma ação desenvolvida por diversas universidades internacionais, Tabela 1, para que as voltas às aulas fossem seguras durante a pandemia. O monitoramento associado a testagem clínica em uma Universidade no Arizona, foi muito importante para a contenção da disseminação do vírus e possibilitou que a universidade continuasse aberta no segundo semestre de 2020 (Betancourt *et al.*, 2021).

O monitoramento de SARS-CoV-2 em comunidades pequenas como de uma universidade é de extrema importância, pois permite a identificação de alunos ou colaboradores positivos a partir do resultado positivo nas amostras de efluentes. A epidemiologia baseada em esgoto foi utilizada como uma ferramenta de alerta em uma universidade em Israel *campus* Technion e garantiu a retomada das aulas nessa. Os alunos e frequentadores do *campus* atestaram estar negativos ou positivos para COVID-19, sendo obrigados a informar todos os dados relacionados à doença, como duração da quarentena, sintomas e resultados dos testes. Os resultados obtidos no estudo foram usados como um “semáforo” (verde para amostras negativas e vermelhas, positivas) a fim de analisar a propagação do vírus no *campus* e conter a disseminação desse, evitando problemas graves. Ao comparar dados de concentração obtidos

no esgoto e os dados clínicos atestado pelos alunos, observou-se uma forte correlação. A comunidade universitária é pequena, e essa correlação foi essencial para identificar casos de COVID-19 desconhecidos. Além disso, os autores encontram um potencial biomarcador da doença, a ferritina, encontrada em níveis elevados para as amostras com RNA do SARS-CoV-2 (Sharaby *et al.*, 2023).

Além dessas, outras universidades realizaram o monitoramento para entender melhor o comportamento do vírus no *campus*. Mohapatra *et al.* (2023), realizaram um monitoramento nas águas residuais da Universidade Nacional de Singapura, concomitantemente com teste de antígenos dos indivíduos que frequentaram o *campus*, sendo esse realizado de uma a duas vezes por semana. Ao encontrar resultados positivos em um ponto, todos os usuários dos sanitários do ponto foram testados de forma imediata. Identificou-se uma forte correlação entre a detecção clínica e dos efluentes. Além disso, os autores realizaram um monitoramento de uso de desinfetantes e antibióticos nos efluentes, e verificaram correlação estatística significativa com o número de casos de COVID-19. Sugeriu-se que o aumento de contaminantes emergentes encontrados no efluente pode estar relacionado com a doença, podendo utilizá-lo como um marcador químico para a doença.

Da mesma forma, Ash e seus colaboradores (2023) realizaram a análise e monitoramento do esgoto e posteriormente testes clínicos foram aplicados nos residentes do *campus*, especificamente dos dormitórios positivos para os fragmentos de RNA viral. Assim, foi possível determinar que a quantidade de cópias de RNA/L encontrada no esgoto esteve correlacionada com o número de casos clínicos presentes na universidade. Com o monitoramento foi possível direcionar a realização dos testes e diminuir os gastos com esses.

Também realizaram o monitoramento via epidemiologia baseada em esgoto na Universidade da Califórnia. Foram utilizados 68 amostradores automáticos contemplando 239 edifícios do *campus*. No período de monitoramento foi possível a obtenção simultânea das concentrações de RNA do SARS-CoV-2, dessa forma, gerou-se notificações, quando as águas residuais se encontravam positivas, para os residentes do *campus*. A epidemiologia baseada em esgoto propiciou o diagnóstico precoce de aproximadamente 85% de casos de COVID-19 na universidade (Karthikeyan *et al.*, 2021).

A Universidade Jaume I, localizada na Espanha, realizou o monitoramento da concentração de fragmentos de RNA viral no *campus* e conseguiu acompanhar cuidadosamente um pico de janeiro a fevereiro de 2021, os resultados foram enviados para o setor responsável pela saúde do *campus* após trinta horas da realização das coletas. A temperatura dos residentes foi monitorada, além disso recomendou-se ações para diminuir as chances de propagação do

vírus dentro da universidade (Llanos *et al.*, 2022).

Na Tabela 1, pode-se observar a concentração de RNA viral encontrada nas universidades, bem como a população contribuinte.

Tabela 1 – Concentrações de RNA viral encontradas em universidades no mundo

Universidade	Concentração (Cópias de RNA/L)	População	Referência
Universidade Jaume I (Espanha)	$1,0 \times 10^4 - 1,0 \times 10^6$	15.000	Llanos <i>et al.</i> (2022)
Universidade de Tennessee-Knoxville (Estados Unidos)	$5,45 \times 10^5$	8.000	Ash <i>et al.</i> (2023)
Universidade de Technion (Israel)	$1,09 \times 10^5$	3.300	Sharaby <i>et al.</i> (2023)
Universidade Nacional de Singapura (Singapura)	$1,0 \times 10^5$	9.090	Mohapatra <i>et al.</i> (2023)
Universidade da Califórnia (Estados Unidos)	$1,0 \times 10^4$	7.614	Karthikeyan <i>et al.</i> (2021)
Universidade de Tulane (Estados Unidos)	N1 $1,75 \times 10^4$ N2 $6,76 \times 10^4$	14.062	Scott <i>et al.</i> (2021)
Universidade do Arizona (Estados Unidos)	N1 $2,63 \times 10^5$ N2 $9,22 \times 10^5$	Não especificada	Betancourt <i>et al.</i> (2021)
Universidade Estadual de Ohio (Estados Unidos)	N1 $3,29 \times 10^4$ N2 $2,69 \times 10^4$	7.767	Lu <i>et al.</i> (2022)

Fonte: Autora (2024).

2.7 CARACTERIZAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUAIS

O esgoto é considerado uma matriz complexa, com muitos parâmetros a ser considerados. Dessa forma, as características físico-químicas e microbiológicas devem ser analisadas, pois podem influenciar na concentração viral de SARS-CoV-2 (Song *et al.*, 2021).

O esgoto doméstico é gerado majoritariamente em residências, porém todas as edificações que apresentam banheiros e cozinhas possuem características semelhantes, pois introduzem basicamente, papéis higiênicos, restos de alimentos e detergentes na rede de esgoto (Brasil, 2004).

O efluente gerado em uma universidade pode ser considerado esgoto doméstico (Papaevangelou; Gikas; Tsihrintzis, 2016). Porém pode apresentar resultados discrepantes em alguns parâmetros (Menezes, 2017). O esgoto pode sofrer alterações de acordo com as características das populações que o utiliza, bem como, as atividades recorrentes e a temperatura de determinado local (Mendes *et al.*, 2022).

Nesse estudo, o monitoramento das características do esgoto possui suma importância, pois a partir dele é possível confirmar que a amostra realmente se tratou de um esgoto com características semelhantes a esse. Fatores, como a diluição do efluente, mascaram os resultados relacionados à concentração de RNA viral, expressando valores não confiáveis. Sendo assim, ao comparar-se a caracterização do esgoto com os valores usuais dos seus parâmetros, mostra-se confiança nos resultados obtidos no estudo.

Na Tabela 2, pode-se observar dados referentes às concentrações encontradas em efluentes domésticos (Muttamara, 1996), e também valores máximos e mínimos ou médias apresentadas por *campus* universitários, sendo, os sólidos totais, sólidos totais fixos, sólidos totais voláteis, sólidos suspensos totais, sólidos suspensos fixos, sólidos voláteis e DQO expostos por Menezes (2017) referente a Universidade Federal de Alfenas – *campus* Poços de Caldas, e DBO, fósforo e sulfato apresentados por Papaevangelou, Gikas e Tsihrintzis (2016), em uma universidade no nordeste da Grécia.

Pode-se observar que o efluente universitário se mostrou instável, apresentando altos valores de desvio padrão para os parâmetros analisados. O pH, sólidos suspensos e DQO variaram de acordo com a quantidade de refeições servidas na universidade (Menezes, 2017).

Ao se considerar a presença de características complexas no esgoto, muitas vezes, variáveis e instáveis, pode-se verificar a relação dessas com a concentração de RNA do SARS-CoV-2, visto que a persistência do vírus no esgoto pode depender de inúmeros fatores, como pH, temperatura, teor de sólidos, matéria orgânica (Tran *et al.*, 2021).

Tabela 2 – Tabela comparativa entre características do esgoto domésticos e obtido em universidades

Parâmetro	Concentração média esgoto doméstico (mg/L) (MUTTAMARA, 1996)	Concentrações em Universidades
		(mg/L) (MENEZES, 2017; PAPAEVANGELOU; GIKAS; TSIHRINTZIS, 2016)
Sólidos totais	500	507,6
Sólidos totais fixos	300	205
Sólidos totais voláteis	200	311,9
Sólidos suspensos totais	220	134,5
Sólidos suspensos fixos	55	24,6
Sólidos suspensos voláteis	165	102,8
Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO)	220	241,6
Demanda Química de Oxigênio (DQO)	500	625,38
Fósforo	8	9,8
Sulfato	20	32,2

Fonte: Autora (2024).

Ao analisar a interferência desses parâmetros encontra-se que o tempo de locomoção do esgoto do ponto de partida até o ponto de coleta, assim como a demanda bioquímica de oxigênio não são fatores que influenciaram a concentração viral, porém a vazão e a temperatura são parâmetros que interferem na permanência do vírus no meio (Schussman; Mcllellan, 2022)

Em contrapartida, Amoah e seus colaboradores (2022), afirmam não haver influência da vazão na quantificação de RNA do SARS-CoV-2, e também da demanda química de oxigênio, já as amostras que apresentam pH mais próximos ao neutro, concentrações mais altas de amônia e sólidos totais em torno de 900 a 1200mg/L encontra-se as maiores concentrações

de RNA viral, ou seja, apresentam interferência significativa nas concentrações. Sendo assim, definir a capacidade de determinado parâmetro físico-químico interferir na concentração do RNA viral garante a eficiência do monitoramento por águas residuais.

Além disso, entender o comportamento do RNA viral também é importante para o armazenamento das amostras que sofrerão futuras análises, já que, a temperatura é um fator que retarda a degradação do RNA viral. Em até 58 dias, a concentração do vírus se mantém estável a uma temperatura de congelamento (-20°C) (Hokajärvi *et al*, 2021).

Nesse contexto, entender o comportamento do esgoto durante as análises de detecção e quantificação de fragmentos de RNA viral se mostra importante. Além disso, entender a correlação entre os parâmetros físico-químicos e a concentração de RNA viral encontrada na amostra possibilita a exposição de dados mais precisos, ademais, presume-se a identificação de biomarcadores para a presença dos fragmentos virais no esgoto.

3 METODOLOGIA

3.1 LOCAL DE AMOSTRAGEM E CONSERVAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras de esgoto bruto foram obtidas no poço de sucção da estação elevatória de esgoto da Universidade Federal de Alfenas – *campus* Poços de Caldas (21°48'59.81"S, 46°39'38.96"O), representada nas Figura 4 e 5.

Figura 4 – Disposição dos prédios da universidade e local de coleta



Fonte: Google Earth (2023).

Figura 5 – Elevatória de esgoto da UNIFAL



Fonte: Autora (2023).

As coletas iniciaram em junho de 2022 perdurando até fevereiro de 2023 (n=23), foram realizadas em semanas específicas, conforme representada na Tabela 3.

Tabela 3 – Coletas realizadas e respectivas datas

Coleta	SE*	Data	Coleta	SE*	Data	Coleta	SE*	Data
C1	24/22	13/06/22	C9	32/22	09/08/22	C17	44/22	08/11/22
C2	25/22	21/06/22	C10	33/22	16/08/22	C18	45/22	16/11/22
C3	26/22	27/06/22	C11	34/22	23/08/22	C19	47/22	29/11/22
C4	27/22	05/07/22	C12	38/22	21/09/22	C20	48/22	06/12/22
C5	28/22	11/07/22	C13	39/22	28/09/22	C21	04/23	24/01/23
C6	29/22	20/07/22	C14	40/22	05/10/22	C22	05/23	31/01/23
C7	30/22	25/07/22	C15	42/22	20/10/22	C23	06/23	07/02/23
C8	31/22	02/08/22	C16	43/22	25/10/22			

Fonte: Autora (2023).

Notas: SE: Semana Epidemiológica.

Nas coletas C1 a C3, foi realizada amostragem composta manual por um período de sete horas e meia, coletado as amostras a cada uma hora e meia. Nas coletas C4 a C23, com o auxílio do amostrador automático ISCO série 6712 (Figura 6), foi realizada a amostragem composta por um período de doze horas com intervalo de uma hora entre as coletas. Chega ao poço de sucção efluente oriundo da contribuição de aproximadamente 1130 usuários por dia, dentre eles técnicos, docentes e alunos.

Figura 6 – Amostrador automático ISCO série 6712 utilizado para realização das coletas



Fonte: Autora (2023).

Figura 7 – Disposição da sonda no poço de sucção da elevatória



Fonte: Autora (2023).

As amostras foram armazenadas em temperatura de resfriamento durante o período de amostragem, com a adição de gelo no amostrador, Figura 8. Ao finalizar a coleta, as amostras foram agrupadas em uma amostra composta (Figura 9) e congeladas a -20°C para posterior análise. A conservação das amostras garantiu as características do esgoto, evitando deturpação dos resultados.

Figura 8 – Acondicionamento dos frascos para amostragem no interior do amostrador



Fonte: Autora (2023).

Figura 9 – Esgoto obtido durante doze horas de coleta



Fonte: Autora (2023).

3.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Inicialmente (C1 a C7) as amostras coletadas foram caracterizadas nas dependências do Departamento Municipal de Água e Esgoto de Poços de Caldas (DMAE), com metodologia própria. Posteriormente foram caracterizadas nos laboratórios de Microbiologia Ambiental e Biotecnologia Anaeróbia da Universidade Federal de Alfenas – *campus* Poços de Caldas, seguindo metodologia específica para cada parâmetro baseando-se no Standart Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2017) e outras metodologias (Tabela 4), sendo eles a demanda bioquímica de oxigênio (DBO), demanda química de oxigênio não filtrada (DQO), pH, série de sólidos, sulfato e fósforo.

Tabela 4 – Parâmetros físico-químicos e microbiológicos e respectivas metodologias

Parâmetro	Código/Metodologia
pH	4500-H+B (APHA, 2017)
DQO	5220B (APHA, 2017)
Sólidos Sedimentáveis	2540 (APHA, 2017)
Sólidos totais	2540 (APHA, 2017)
Sólidos totais fixos	2540 (APHA, 2017)
Sólidos totais voláteis	2540 (APHA, 2017)
Sólidos suspensos totais	2540 (APHA, 2017)
Sólidos suspensos voláteis	2540 (APHA, 2017)

(continua)

Tabela 4 – Parâmetros físico-químicos e microbiológicos e respectivas metodologias
(conclusão)

Parâmetro	Código/Metodologia
Sólidos suspensos fixos	2540 (APHA, 2017)
Fósforo total	(Valderrama, 1981; Strickland; Parsons, 1972).
Sulfato	4500-SO ₄ 2- (APHA, 2017)
DBO	NBR 12614 (ABNT, 1992)

Fonte: Autora (2023).

3.3 DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO SARS-CoV-2

Durante todo o período de desenvolvimento, o projeto esteve inserido na Rede de Monitoramento de COVID-19 em Águas Residuais – MCTI (REMONAR), juntamente com diversos grupos de pesquisa, que contribuíram para divulgação de trabalhos baseados no monitoramento de águas residuais, além de fornecer apoio científico e tecnológico para efetivação da pesquisa. As amostras foram enviadas, conforme mostra a Figura10, para o Laboratório de Biologia Molecular Ambiental da Universidade Federal do ABC (UFABC), onde foram realizadas a detecção e quantificação do SARS-CoV-2. Para obtenção dos resultados seguiu as etapas de concentração, extração e amplificação do RNA viral de acordo com metodologias específicas.

Figura 10 – Amostras enviadas para UFABC



Fonte: Autora (2023).

3.3.1 Concentração do material genético nas amostras de esgoto

O procedimento de concentração do material genético presente nas amostras de esgoto bruto realizado pela UFABC ocorreu a partir de uma modificação da técnica de concentração com polietilenoglicol (PEG) (Cabral *et al.*, 2020). Essa etapa consistiu na recuperação das partículas virais e ácidos nucleicos suspensos no esgoto. Em um tubo falcon de 50mL, foi adicionado 0,9g de cloreto de sódio (NaCl), e 4g de polietilenoglicol (PEG) 8000, em seguida foi adicionado 40 mL das amostras, foi homogeneizado o conteúdo do tubo para dissolução dos reagentes. Para facilitar a precipitação os tubos foram colocados na geladeira por 30 minutos e posteriormente realizou a centrifugação em centrífuga refrigerada (4°C) por 1 hora a 15.000xg ou 2 horas a 7.500xg. Após centrifugação a parte aquosa foi descartada, eliminando todo excesso de líquido e mantendo o pellet no tubo. O pellet foi lavado com 0,4 mL de solução tampão salina-fosfato (PBS) 1x estéril, para completa remoção dele. Em um microtubo com o pellet e o PBS foi adicionado 1,0 mL de fenol ácido, em seguida o conteúdo do microtubo foi homogeneizado e obteve-se uma amostra com aspecto leitoso, que foi congelada a -20°C para realizar a etapa de extração do RNA nos dias seguintes. Para determinação da eficiência da concentração verificou-se a recuperação do plasmídeo pET28a, utilizando PCR e eletroforese em gel de agarose 1% corado com UniSafe Dye® para visualizar a recuperação pelo fotodocumentador UV (Cabral *et al.*, 2020).

3.3.2 Extração do RNA do SARS-CoV-2

Para a extração foi utilizado o PureLink RNA Mini Kit, seguindo a metodologia exposta por Cabral *et al.*, (2020). Sendo assim, as amostras foram descongeladas e em seguida homogeneizadas para garantir a aparência leitosa, adquirida na etapa de concentração. Em seguida foi realizada a centrifugação na centrífuga refrigerada a 4°C por 10 minutos a 12.000g para limpar a amostra. A parte aquosa oriunda da centrifugação, continha os fragmentos de RNA viral. Dessa forma, a amostra foi adicionada a 0,3 mL de *Lysis Solution* em um microtubo. Em seguida foi adicionado 1 mL de etanol 70%, homogeneizou. Foi transferido 0,7 mL de material para a coluna do kit de extração e foi centrifugado por 1 minuto a 12.000g, repetiu o procedimento por duas vezes até que toda a amostra passou pela coluna. Posteriormente foi realizada a lavagem para retirada de contaminantes, ela foi realizada com 0,7 mL de *Wash Buffer I*, e centrifugou por 1 minuto a 12.000g, descartou o filtrado. Em seguida acrescentou 0,5 mL de *Wash Buffer II* e centrifugou novamente por 1 minuto a 12.000g. O procedimento

foi repetido. Após a segunda lavagem, o filtrado foi totalmente descartado e centrifugou apenas a coluna para que não tivesse excesso de etanol, deixando-a totalmente seca. Por fim, a coluna foi transferida para um novo microtubo, onde foi adicionado 80 μL água ultrapura livre de RNase, fazendo o desligamento do ácido nucleico da coluna e recuperado no novo microtubo após centrifugação por 2 minutos a 12.000g. O RNA extraído foi congelado a -80°C . A taxa de recuperação viral para verificação da eficiência da concentração e extração foi realizada a partir da contaminação da amostra pelo RNA de um vírus respiratório bovino, a submeteu aos mesmos procedimentos de concentração e extração e realizando o RT-qPCR, a fluorescência emitida foi capturada e realizou-se a quantificação pela curva padrão e o cálculo da taxa de recuperação.

3.3.3 Detecção e quantificação do SARS-CoV-2

Após as etapas de concentração e extração do RNA viral, realizou-se a etapa de detecção e quantificação desse. Para cada 5 μL de amostra utilizou-se 10 μL de master mix, 1,5 μL de primer e sonda específicos para a região gênica N1 e N2 do SARS-CoV-2 de acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) (Tabela 5), 3,15 μL de água livre de nucleases e 0,35 μL de SuperScript III RT/Platinum Taq. Após a junção de todos reagentes, foram homogeneizados e adicionados com a amostra nas cavidades da placa para PCR, totalizando o volume de 20 μL de reação em cada poço. Para controle negativo trocou o volume de amostra por água livre de nucleases. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Tabela 5 – Tabela de primers e sondas utilizadas para detecção do SARS-CoV-2

Função	Nome	Sequência	Referência
Sonda TaqMan	2019-nCoV_N1	5'-FAM-ACCCCGCATTACGTTTGGTGGACC-BHQ1-3'	(CDC, 2023)
Primer foward	2019-nCoV_N1-F	5'-GACCCCAAATCAGCGAAAT-3'	(CDC, 2023)
Primer reverse	2019-nCoV_N1-R	5'-TCTGGTTACTGCCAGTTGAATCTG-3'	(CDC, 2023)
Sonda TaqMan	2019-nCoV_N2	5'-FAM-ACAATTTGCCCCAGCGCTTCAG-BHQ1-3'	(CDC, 2023)
Primer foward	2019-nCoV_N2-F	5'-TTACAAACATTGGCCGCAA-3'	(CDC, 2023)
Primer reverse	2019-nCoV_N2-R	5'-GCGCGACATTCCGAAGAA-3'	(CDC, 2023)

Fonte: Autora (2023).

Em seguida a placa foi transferida ao termociclador CFXOpus 96 (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) para ocorrer a RT-qPCR. No termociclador ocorreu 4 ciclos, constituído pelas etapas de 1. confecção do DNA complementar por meio da transcrição reversa a 50°C por 30 minutos, 2. inativação da enzima transcriptase reversa a 95°C por 3 minutos, 3. 45 ciclos de desnaturação (95°C por 3 segundos) e 4. anelamento (55°C por 30 minutos) (CDC, 2023). Os resultados da quantificação foram gerados baseando-se nos valores da curva padrão, esta foi realizada utilizando como controle positivo um plasmídeo com fragmentos de N1 e N2 (*2019-nCoV RT-PCR Positive Control, Norgen #cat PC67102*), e esse foi diluído em um fator 1:10 para confecção da curva padrão, Anexos A e B (Bueno *et al.*, 2022). Os dados foram enviados para Universidade Federal de Alfenas, onde foram analisados e organizados.

3.4 DETERMINAÇÃO DA VAZÃO E CARGA VIRAL

Para determinação da vazão do esgoto, foi utilizada a vazão estimada, medida de forma indireta a partir do volume de água gasto por mês na universidade. Esse método baseou-se no conceito de Von Sperling (2014), que determina a aplicação de um coeficiente de retorno ao volume de água consumido, cujo valor é de 0,8, e assim, torna-se possível determinar o volume de água que volta pela rede coletora de esgoto em um período de tempo. No estudo, foi obtido o volume de consumo a partir das contas de água disponibilizadas pelo Departamento Municipal de Água e Esgoto de Poços de Caldas (DMAE). Utilizou-se os dados de vazão para determinação da carga viral (cópias/dia).

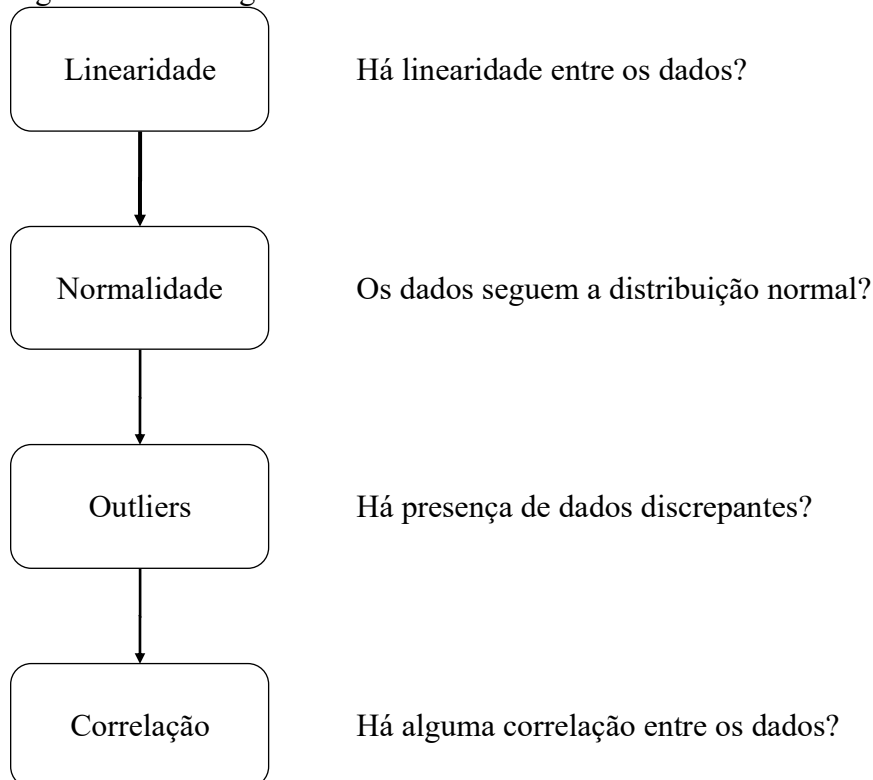
A partir da estimativa da vazão do esgoto da universidade, pode-se estimar a carga viral dos fragmentos de RNA encontrados em cópias/dia pela multiplicação da vazão (L/s) pela concentração de RNA viral (cópias/L), Equação 1.

$$\text{Carga viral (cópias/dia)} = \text{Vazão (L/s)} * \text{Conc. de RNA viral (cópias/L)} * 86400 \text{ (s/dia)} \quad (1)$$

3.5 PROCEDIMENTO ESTATÍSTICO

O fluxograma do procedimento estatístico adotado para análise dos dados é apresentado na Figura 11.

Figura 11 – Fluxograma do tratamento estatístico adotado aos dados experimentais



Fonte: Autora (2024).

3.5.1 Linearidade

A análise da linearidade se deu por meio da construção de gráficos de dispersão entre as variáveis de interesse, características do esgoto sanitário, e os valores das concentrações dos fragmentos de RNA viral, calculando-se o seu coeficiente de determinação (r^2). Sabendo que um dos pressupostos mais importantes da linearidade é a distribuição normal dos dados, realizou-se a análise da normalidade dos dados. Caso não fossem normais, a análise da linearidade em tais condições não é adequada.

3.5.2 Normalidade

É essencial avaliar se os dados seguem uma distribuição normal, pois a maioria dos métodos estatísticos conta com essa suposição. Isso nem sempre se confirma, especialmente em amostras pequenas, como apontado por Ghasemi e Zahediasl (2012). Assim, utilizou-se o teste de teste de Shapiro-Wilk (Shapiro; Wilk, 1965) nas amostras do estudo.

3.5.3 Detecção de *outliers*

Para a detecção de *outliers*, foi utilizado o intervalo interquartil (IQR) (Equação (2)), que não depende da normalidade e é calculado como sendo a diferença entre o terceiro quartil (Q3) e o primeiro quartil (Q1) dos dados. Valores que estão abaixo de $Q1 - 1.5 \times IQR$ ou acima de $Q3 + 1.5 \times IQR$ são frequentemente considerados *outliers* (Bussab; Morettin, 2023). Para facilitar a visualização dos *outliers*, foram construídos gráficos do tipo boxplot que representam fielmente os quartis dos dados experimentais. Além disso, os dados foram normalizados para que diferentes variáveis em escala de medida diferentes pudessem ser representadas no mesmo gráfico.

$$IQR = Q_3 - Q_1 \quad (2)$$

Em que:

IQR = Intervalo interquartil

Q_3 = terceiro quartil

Q_1 = primeiro quartil

3.5.4 Correlação entre as variáveis

A partir da análise da normalidade e dos *outliers*, faz-se necessário estabelecer se a correlação de Pearson (dados normais) ou de Spearman (dados não normais) deve ser utilizada. Após a avaliação da normalidade, considerou-se a ausência de normalidade em grande parte dos dados experimentais, dessa forma foi determinada a correlação entre as variáveis pela correlação de Spearman. Esta correlação não pressupõe uma relação linear, nem distribuição normal dos dados. Em vez disso, avalia a monotonicidade da relação entre as variáveis; ou seja, à medida que uma variável aumenta, a outra variável tende a aumentar ou diminuir, mas não necessariamente a uma taxa constante.

3.5.5 Software

Todos os cálculos matemáticos e estatísticos foram realizados no *software* R[®], versão 4.3.1 (R Core Team, 2023). Foi utilizada a interface de desenvolvimento RStudio[®] 2023.12.1 (Posit team, 2024).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DETECÇÃO DE FRAGMENTOS DO RNA VIRAL

As amostras coletadas na universidade representam a contribuição de aproximadamente 1130 pessoas que utilizam da rede sanitária diariamente. Durante o período de coleta, de junho de 2022 a fevereiro de 2023, foi possível obter 23 amostras (n=23). O efluente que chega ao poço de sucção da elevatória de esgoto, abrange 100% da universidade, possibilitando a detecção de fragmentos do RNA do SARS-CoV-2 excretados por todos os alunos e colaboradores nas semanas epidemiológicas analisadas.

A taxa de detecção do SARS-CoV-2 no esgoto é diretamente proporcional à população contribuinte do efluente, ou seja, quanto maior a população mais fácil de detectar RNA viral (Wu *et al.*, 2021). Mesmo que a população do presente estudo seja pequena, todas as amostras analisadas (100%) se apresentaram positivas para pelo menos uma região do nucleocapsídeo (N1 ou N2) do SARS-CoV-2 durante o período de amostragem e análises, conforme mostra a Tabela 6. Isso indica que em todas as semanas analisadas do primeiro e segundo semestre letivo de 2022, houve pessoas dentro da universidade infectadas pelo SARS-CoV-2, que excretaram o RNA viral no esgoto.

Lu e seus colaboradores (2022), também detectaram a presença de RNA viral em todas as amostras obtidas na Universidade Estadual de Ohio (Estados Unidos da América), em contrapartida apenas 12,05% das amostras obtidas na Universidade da Carolina do Norte (Estados Unidos da América) apresentaram-se positivas para SARS-CoV-2 (Gibas *et al.*, 2021), semelhante a essa porcentagem Sharaby *et al.* (2023), encontraram 11,50% de amostras positivas na Universidade Technion (Israel), e na Universidade Jaume I (Espanha) obtiveram 27,9% das amostras positivas (Llanos *et al.*, 2022).

Pode-se observar que a frequência da detecção de RNA do SARS-CoV-2 é variável dentro das universidades, porém, em todas estiveram presentes o material genético do vírus, mesmo que em frequências baixas. Esse fato pode estar associado às universidades possuírem altas taxas de disseminação do SARS-CoV-2, devido às grandes aglomerações dos discentes com baixo distanciamento social dentro e fora da sala de aula (Wilson *et al.*, 2020).

Tabela 6 – Resultados da detecção do SARS-CoV-2 na UNIFAL

Data	Coleta	Semana Epidemiológica	N1	N2
13/06/22	C1	24/22	+	
21/06/22	C2	25/22	+	
27/06/22	C3	26/22	+	
05/07/22	C4	27/22	+	
11/07/22	C5	28/22	+	
20/07/22	C6	29/22	+	
25/07/22	C7	30/22	+	
02/08/22	C8	31/22	+	
09/08/22	C9	32/22	+	
16/08/22	C10	33/22	+	+
23/08/22	C11	34/22	+	
21/09/22	C12	38/22	+	
28/09/22	C13	39/22	+	
05/10/22	C14	40/22	+	
20/10/22	C15	42/22	+	
25/10/22	C16	43/22	+	
08/11/22	C17	44/22	+	
16/11/22	C18	45/22	+	
29/11/22	C19	47/22	+	
06/12/22	C20	48/22	+	+
24/01/23	C21	04/23	+	
31/01/23	C22	05/23	+	
07/02/23	C23	06/23	+	

Fonte: Autora (2023).

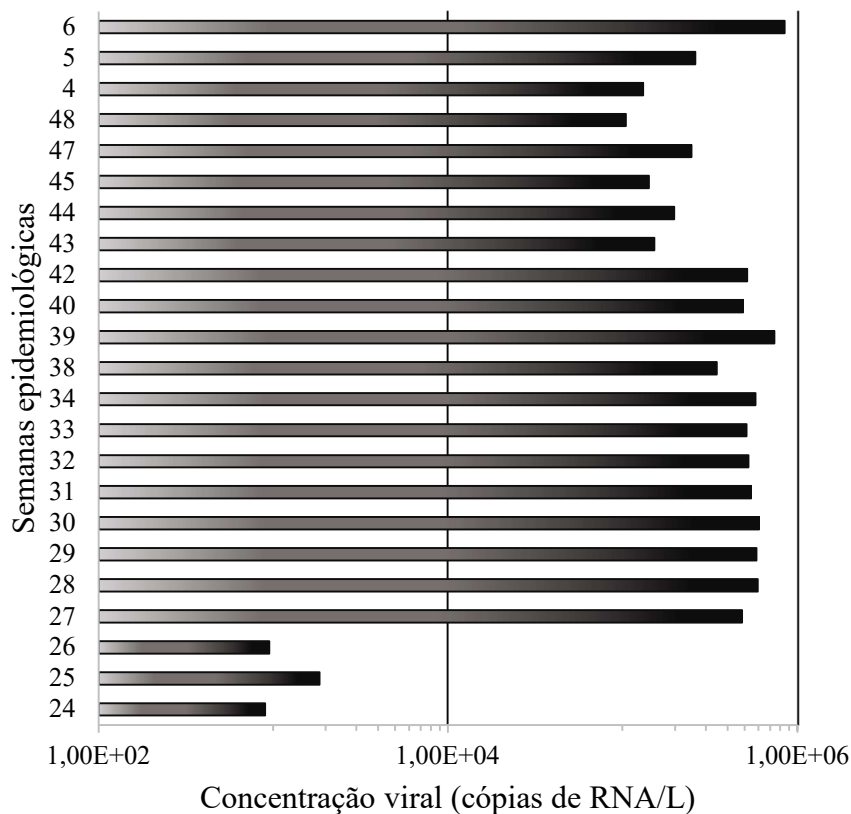
Em 100% das amostras a região gênica N1 foi amplificada, enquanto apenas 8,70% apresentaram a amplificação da região N2. Scott e seus colaboradores (2021), detectaram RNA viral em 54,2% das amostras para região N1 e 54,2% para a região N2, as duas regiões foram amplificadas simultaneamente em 49,5% das amostras obtidas na Universidade de Tulane em Nova Orleans (Estados Unidos). Hong *et al.* (2021) evidenciam a sensibilidade da região N1 para detecção de RNA viral no efluente, ou seja, comparando-se com N2, a região N1 precisa da presença de um menor número de pessoas positivadas para a COVID-19 para ser detectada pelo RT-PCR. Isso reafirma o que foi exposto por Vogels e seus colaboradores (2020), observado pelos valores mais baixos de Ct. Kazenelson *et al.* (2023), também comparou os valores de Ct em amostras obtidas no *campus* da Universidade da Carolina do Norte Wilmington, e para N1 foram inferiores quando comparados com N2, sugerindo uma maior sensibilidade dos iniciadores N1. Esses dados corroboram com os resultados obtidos no presente estudo, os quais apresentaram detecção preferencial na região N1, possivelmente, isso

ocorreu devido ao número de contribuintes para o efluente da universidade ser baixo, e consequentemente, o número de pessoas com a doença também é menor, quando se compara com os números de uma cidade, por exemplo. Como região gênica N1 se apresentou mais sensível, foi detectada com maior frequência.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RNA VIRAL

A concentração de RNA viral foi quantificada pela técnica de RT-qPCR. Na Figura 12, é possível observar nas três primeiras semanas epidemiológicas (24, 25 e 26) uma concentração baixa de RNA viral, que variou de 10^2 a 10^3 cópias de RNA/L. Nas 20 semanas seguintes houveram pequenas variações na concentração de RNA viral de uma semana para outra, mantendo-se na ordem de 10^5 cópias de RNA/L. A divergência das três primeiras semanas para as seguintes pode estar relacionada pela forma de amostragem, pois as coletas C1, C2 e C3, foram amostradas manualmente, por um período menor. Mesmo que não seja alarmante, o resultado positivo indica a presença de pessoas positivas dentro da universidade.

Figura 12 – Quantificação da concentração de RNA viral nas semanas epidemiológicas



Fonte: Autora (2024).

A média obtida por todas semanas epidemiológicas analisadas foi de $3,74 \times 10^5$ cópias de RNA/L com desvio padrão de $2,44 \times 10^5$. Resultados semelhantes foram encontrados por Ash e seus colaboradores (2023), que obtiveram uma média de $5,45 \times 10^5$ cópias de RNA/L, no *campus* da Universidade de Tennessee-Knoxville (Estados Unidos da América) que apresenta uma população de 8.000 pessoas. Na Universidade Nacional de Singapura (Singapura) também encontraram concentrações de ordem semelhante ($1,0 \times 10^5$ cópias de RNA/L), com 9.090 estudantes (Mohapatra *et al.*, 2023) e na Universidade de Technion (Israel) com concentrações médias de $1,09 \times 10^5$ cópias de RNA/L, com contribuição de 3.300 pessoas (Sharaby *et al.*, 2023).

A discrepância entre os valores de população pode ser observada. Pois as concentrações obtidas são semelhantes entre todos os estudos aqui apresentados e o presente estudo. Porém, o número de contribuintes não, variando de 1130 a 9090 pessoas. Ao se considerar a razão entre média de concentração viral pela população contribuinte do efluente, observa-se 330,97 RNA/L.pessoa para o estudo atual, 68,13 RNA/L.pessoa para a Universidade de Tennessee-Knoxville (Estados Unidos da América), 11,00 RNA/L.pessoa para a Universidade Nacional de Singapura e 33,03 para a Universidade de Technion em Israel (Ash *et al.*, 2023; Mohapatra *et al.*, 2023; Sharaby *et al.*, 2023). Assim, a Universidade Federal de Alfenas – *campus* Poços de Caldas (Brasil), possui uma razão extremamente acima do observado na literatura, enquanto as outras universidades com concentrações semelhantes, apresentam valor baixos, porém também apresentam divergências, mesmo que menores, entre si.

A estimativa de pessoas que contribuíram para detecção e quantificação do SARS-CoV-2 é muito subjetiva, visto que as comunidades não possuem um valor fixo de RNA viral excretado, a população a depender de suas características sociais e fisiológicas possuem uma taxa específica de excreção de RNA viral por meio das fezes (Prasek *et al.*, 2022). Fluidos corporais diversos apresentam SARS-CoV-2, entre eles estão urina, fezes, escarros e sangue, considerando a possibilidade de que essas excretas possam ser lançadas na rede de esgoto, deve-se leva-las em consideração para realizar uma estimativa da população infectada pelo vírus (Li *et al.*, 2022). Dessa forma fazer uma estimativa usando apenas a quantidade de SARS-CoV-2 eliminados pelas fezes se torna muito superficial.

Os dados de vazão de esgoto foram obtidos por Von Sperling (2014), considerando um retorno de 80% da água consumida mensalmente na universidade. A partir do consumo de água, foi possível estimar a carga viral dos fragmentos de RNA encontrados em cópias/dia, Tabela 7.

Tabela 7 – Carga viral dos fragmentos de RNA a partir dos dados estimados de vazão

Data	Coleta	SE	Consumo mensal (m ³)	Vazão (L/s)	Concentração (cópias/L)	Carga viral (cópias/d)
13/06/22	1	24	270	0,0456	9,00E+02	3,55E+06
21/06/22	2	25	270	0,0492	1,80E+03	7,65E+06
27/06/22	3	26	270	0,0565	9,50E+02	4,64E+06
05/07/22	4	27	465	0,0430	4,80E+05	1,78E+09
11/07/22	5	28	465	0,1425*	5,90E+05	7,26E+09
20/07/22	6	29	465	0,1425*	5,80E+05	7,14E+09
25/07/22	7	30	465	0,1425*	6,00E+05	7,39E+09
02/08/22	8	31	350	0,1080*	5,40E+05	5,04E+09
09/08/22	9	32	350	0,1080*	5,30E+05	4,95E+09
16/08/22	10	33	350	0,1080*	5,10E+05	4,76E+09
23/08/22	11	34	350	0,1080*	5,80E+05	5,41E+09
21/09/22	12	38	285	0,0880	3,50E+05	2,66E+09
28/09/22	13	39	285	0,0880	7,40E+05	5,63E+09
05/10/22	14	40	260	0,0802	4,90E+05	3,40E+09
20/10/22	15	42	260	0,0802	5,20E+05	3,60E+09
25/10/22	16	43	260	0,0802	1,50E+05	1,04E+09
08/11/22	17	44	175	0,0540	2,00E+05	9,33E+08
16/11/22	18	45	175	0,0540	1,40E+05	6,53E+08
29/11/22	19	47	175	0,0540	2,48E+05	1,16E+09
06/12/22	20	48	84	0,0259	1,05E+05	2,35E+08
24/01/23	21	4	176	0,0543	1,31E+05	6,15E+08
31/01/23	22	5	176	0,0543	2,61E+05	1,22E+09
07/02/23	23	6	143	0,0441	8,46E+05	3,22E+09

Fonte: Autora (2023).

Nota: Nos períodos destacados, ocorreram procedimentos de irrigação na UNIFAL, podendo estar relacionada com valores mais altos de vazão.

As cargas virais são parâmetros que podem ser utilizados para informar a entidade competente de saúde acerca das tendências que determinada doença de transmissão comunitária possui, quando a testagem é escassa (Corchis-Scott *et al.*, 2021). Elas permitem estimar a quantidade de cópias de RNA viral por dia, que foram encontradas no efluente no dia da coleta a partir da estimativa da vazão mensal.

A média da carga viral encontrada durante todas as semanas analisadas no estudo foi de $2,96 \times 10^9$ com desvio padrão de $2,48 \times 10^9$ cópias de RNA/dia para uma população estimada de 1130 pessoas que frequentam a UNIFAL, e uma vazão média de 0,79 L/s. Augusto e seus colaboradores (2022), observaram que para uma população de 1,4 milhões de habitantes, e vazão de 2.838 L/s, foi encontrada uma carga viral que variou de 1×10^{13} a 1×10^{14} cópias de

RNA/dia em uma ETE de larga escala no ABC Paulista, Brasil. Em Goiânia, foram analisadas amostras durante as semanas epidemiológicas de 2021 e 2022, e entre as semanas analisadas positivas, a carga viral se apresentou entre $1,0 \times 10^{14}$ a $1,0 \times 10^{16}$ cópias de RNA/dia, para uma população de 1,1 milhões de pessoas (Mendes *et al.*, 2022). Diferenças são encontradas entre a literatura e o presente estudo, principalmente pela quantidade de pessoas que contribuem para o efluente. Na universidade a população é extremamente baixa quando se compara com uma cidade e pode-se observar uma diferença de no mínimo 4 ordens entre o presente estudo e os dois outros aqui apresentados, o que é esperado, pela divergência da população contribuinte.

4.3 CENÁRIO DA PANDEMIA DA COVID-19 NAS SEMANAS ANALISADAS

Durante o período de coleta fez-se importante contextualizar a situação do estado de Minas Gerais, bem como da cidade de Poços de Caldas, onde está localizada a universidade da presente pesquisa. Os dados foram baseados nos boletins informativos da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL, 2022) e nos dados da Prefeitura Municipal de Poços de Caldas (POÇOS DE CALDAS, 2023).

Ao iniciar as coletas no dia 13 de junho de 2022, o número de casos em Minas Gerais se encontrava em crescimento, vale enfatizar que os óbitos, comparando com junho de 2021, apresentaram seis vezes menores. O Sul de Minas Gerais, região que integra a cidade de Poços de Caldas, apresentou maior taxa de incidência diária semanal. Em Poços de Caldas a semana foi marcada por crescimento no número de casos e óbitos. No dia 21 de junho, segunda coleta, foi marcada pelo provável fim da segunda onda da variante Ômicron. Houve uma pequena interrupção do aumento de casos em Minas Gerais, e em Poços de Caldas houve estabilidade no número de casos, em contrapartida, houve aumento no número de óbitos. No dia da terceira coleta, 27 de junho de 2022, os casos voltaram a aumentar em Minas Gerais, devido a um feriado nacional. Em Poços de Caldas, o número de casos diminuiu e o de óbitos esteve em crescimento.

Na primeira de semana de julho, quarta coleta, Poços de Caldas apresentou estabilidade no número de óbitos e os casos começaram a aumentar novamente, o primeiro ocorreu devido ao aumento da cobertura da vacinação e o segundo pelo relaxamento das medidas preventivas. Na quinta coleta, dia 11 de julho de 2022, o número de casos se estabilizou na cidade de Poços de Caldas e o número de óbitos caiu. No dia 20 de julho de 2022, observou-se a insuficiência da vacina para conter o rápido contágio, e iniciou uma mobilização para utilizar máscaras, embora na cidade ainda houvesse queda no número de casos e estabilidade nos óbitos. Na

semana seguinte, 25 de julho de 2022, houve crescimento no número de casos e de óbitos em Poços de Caldas, e as crianças se tornou uma classe vulnerável.

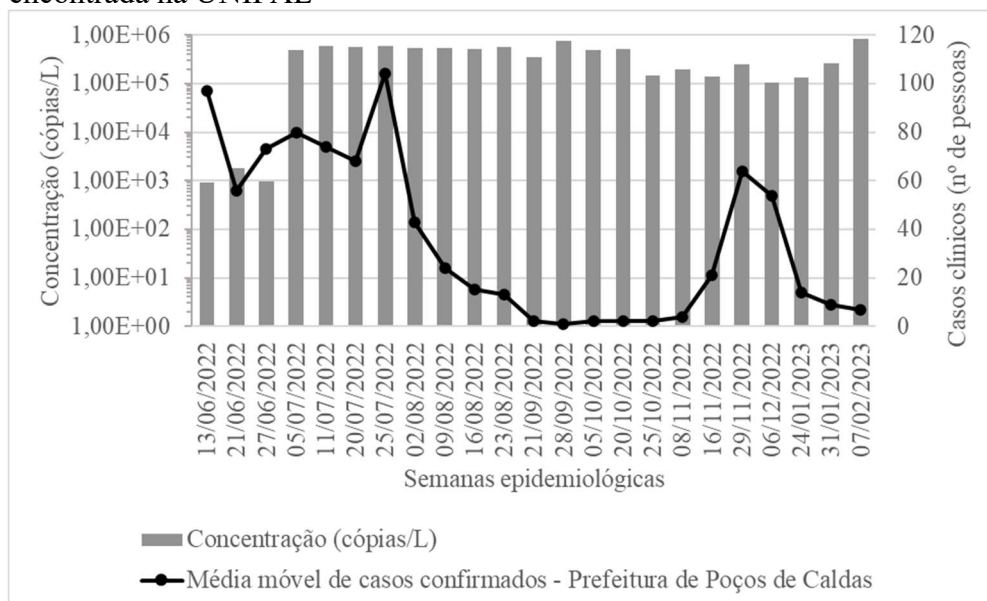
No mês de agosto, houve 4 semanas de coletas, sendo que ao início do mês observou-se uma estabilidade no número de casos, seguido por quedas nas próximas semanas. E os óbitos iniciaram o mês em queda, porém nas duas últimas semanas observou-se um aumento. Vale ressaltar que nesse período houve riscos de subnotificação de novos casos, visto que, a população negligenciou em relação à COVID-19.

A partir de setembro até outubro de 2022, realizou-se 5 coletas, as quais foram marcadas por um ótimo período, com queda no número de óbitos, estabilização do número de casos.

Em novembro do mesmo ano, surgiu a subvariante BQ.1, com maior risco de contágio, por isso, foi necessária a conscientização sobre a utilização de máscaras e distanciamento social novamente. Minas Gerais, especialmente o Sul de Minas, viveu uma nova onda da COVID-19, perdurando até dezembro, acreditando-se que as festividades da Copa do Mundo refletiram negativamente no estado da doença em Minas Gerais, acelerando o contágio que já vinha crescendo no mês anterior. Em janeiro e fevereiro de 2023, três últimas coletas do presente estudo, a média móvel de casos e óbitos foi baixa, a vacinação se estendeu para bebês nesse período, trazendo maior cobertura da vacina.

Após a contextualização sobre a pandemia no período de coleta da presente pesquisa, foi possível comparar as concentrações encontradas no esgoto da UNIFAL, com a média móvel de casos confirmados pela Prefeitura Municipal de Poços de Caldas, Figura 13.

Figura 13 – Média móvel de casos em Poços de Caldas e a concentração de RNA viral encontrada na UNIFAL



Fonte: Autora (2024).

Pode-se observar que em Poços de Caldas e no estado de Minas Gerais como um todo, o período que se realizou a coleta foi marcado por instabilidades, com aumento e queda no número de casos e óbitos, adquirindo estabilidade nos meses de setembro e outubro de 2022. No entanto, na Universidade Federal de Alfenas, a concentração dos fragmentos de RNA viral permaneceu constante desde a quarta coleta, em julho de 2022 até a última coleta, em fevereiro de 2023. Dessa forma, a universidade da presente pesquisa não consegue por si só emitir alerta precoce para a cidade Poços de Caldas, possivelmente por envolver alunos residentes em cidades alheias, que não foram contabilizados nas médias móveis municipais.

4.4 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS E MICROBIOLÓGICAS DO ESGOTO

As características físico-químicas e microbiológicas de um efluente possuem uma forte relação com o comportamento da sociedade, nos âmbitos sociais, culturais em que ela se enquadra. Bertolino, Carvalho e Aquino (2008), constataram que os parâmetros físico-químicos de um *campus* universitário se assemelharam com a caracterização do esgoto doméstico.

As características físico-químicas e microbiológicas dos efluentes coletados no decorrer do presente estudo, estão expostas no Apêndice A. Na Tabela 8, pode-se observar os valores máximos, mínimos, média e o desvio padrão dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados, levando em consideração as 23 coletas realizadas.

Tabela 8 – Valores obtidos dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados

Parâmetro	Mínimo (mg/L)	Máximo (mg/L)	Média (mg/L) (n=23)	(continua)
				Desvio Padrão (mg/L) (n=23)
DQO	229	1336	531	257
DBO	39	908	234	204
ST	234	1269	550	211
STV	22	894	301	196
STF	12	410	250	98
SST	56	920	157	183
SSV	30	787	127	157
SSF	6	133	31	29
Fósforo	1,89	11,36	5,89	2,63
Sulfato	10,84	61,40	34,37	13,93

Tabela 8 – Valores obtidos dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos analisados

Parâmetro	Mínimo	Máximo	Média (n=23)	Desvio Padrão (n=23)
pH	7,75	8,96	8,49	0,27
Parâmetro	Mínimo (mL/L)	Máximo (mL/L)	Média (mL/L) (n=23)	Desvio Padrão (mL/L) (n=23)
Sólidos sedimentáveis	0,10	25,00	2,70	5,36

Fonte: Autora (2024).

A média dos parâmetros obtidos para o efluente da UNIFAL durante o período analisado se assemelham com as concentrações gerais de esgoto doméstico exposto por Muttamara (1996), Tabela 2. Também corresponde ao exposto por Papaevangelou, Gikas e Tsihrintzis (2016), que desenvolveram um estudo, o qual analisou parâmetros como DBO, DQO, fósforo, sulfato e pH de um aflente universitário, antes de entrar para o tratamento específico, no nordeste da Grécia.

O pH da universidade do presente estudo variou de 7,75 a 8,96, com média de 8,49 \pm 0,27. Nessa mesma universidade obteve-se valores de média, mínimo e máximo de 7,07, 4,51 e 8,02 respectivamente (Menezes, 2017). Outros valores de pH foram encontrados na literatura em universidades internacionais; em Marrocos, o pH variou de 7,18 a 8,18 (Grimah *et al.*, 2023), e na Grécia, com o valor de 7,5 (Papaevangelou; Gikas; Tsihrintzis, 2016).

Pôde-se observar que o efluente gerado na UNIFAL permaneceu básico durante todo o período de análise. A principal hipótese dessa constatação seria o descarte inadequado de resíduos laboratoriais alcalinos na rede de esgoto da universidade. Estudos podem ser desenvolvidos para buscar quais as atividades realizadas atualmente dentro da universidade, que estão elevando o pH, visto que em 2017 foram observados valores próximos ao neutro. Além disso, conscientizar os usuários dos laboratórios sobre o manejo e gerenciamento de resíduos dentro desses.

Valores dos sólidos foram comparados com os parâmetros da mesma universidade apresentado por Menezes (2017), os quais variaram de 221 a 1254 mg/L os sólidos totais, 97,00 a 965,00 mg/L, sólidos totais voláteis, 0 a 580 mg/L os sólidos totais fixos. Considerando os sólidos totais, pôde-se observar semelhança nos dados, sendo, 234,00 mg/L a 1269,00 mg/L para o presente estudo. Em relação aos sólidos suspensos totais, obteve-se valores que variaram

de 56,00 a 920 mg/L, diferindo-se do valor encontrado na universidade em 2017, com variação de 3,33 a 486,67 mg/L (Menezes, 2017).

Os valores de fósforo total obtidos variaram de 1,89 a 11,36 mg/L, encontrou-se resultados que variaram de 0,25 a 9,8 mg/L em universidades internacionais (Grimah *et al.* 2023; He *et al.* 2018; Paevangelou; Gikas; Tsihrintzis, 2016). Enquanto que para sulfato, encontrou-se valores variando de 10,84 a 61,40 mg/L com média de $34,37 \pm 13,93$ mg/L, valor próximo ao encontrado por Papaevangelou, Gikas e Tsihrintzis (2016), 32,2 mg/L.

Em relação aos parâmetros de DQO e DBO, observou-se valores variando de 228,50 a 1336,00 mg/L, média de $531,02 \pm 256,63$ mg/L, e variação de 39,42 a 908,10 com média de $233,93 \pm 204,22$ mg/L, respectivamente. Na UNIFAL, em 2017, o valor mínimo da DQO encontrado foi de 28,00 mg/L, extremamente abaixo do encontrado no presente estudo, contudo o valor máximo apresentou proximidade, sendo de 1650,00 mg/L (Menezes, 2017). Outros valores de DQO foram encontrados em universidades, variando de 126,00 a 1151,00 mg/L (Grimah *et al.* 2023; He *et al.* 2018; Papaevangelou; Gikas; Tsihrintzis, 2016). Para DBO, encontrou-se valores semelhantes em uma universidade localizada na Grécia, de 241,60 mg/L (Papaevangelou; Gikas; Tsihrintzis, 2016). A razão de biodegradabilidade do efluente da UNIFAL foi calculada. Obteve-se DQO/DBO_{5,20} de 2,27, esse valor é usualmente observado em esgoto doméstico bruto, o qual se apresenta entre 1,7 a 2,4. Valores altos da razão indicam a presença considerável de materiais inertes, e deve observar a possibilidade de realizar um tratamento físico-químico caso ocorra, enquanto valores baixos mostram alta quantidade de material biodegradável, que é facilmente removido do efluente por tratamentos biológicos (Von Sperling, 2014). Portanto, o esgoto da universidade apresentou boa biodegradabilidade, não necessitando de tratamento físico-químicos específicos, dessa forma, o tratamento biológico seria suficiente para trata-lo.

Os parâmetros apresentados variaram de forma significativa durante as coletas realizadas, o que mostra instabilidade no esgoto da Universidade Federal de Alfenas. Apesar disso, as características apresentadas no esgoto mostraram que, de fato, o efluente apresentou comportamento semelhante ao esgoto doméstico, dessa forma, os resultados obtidos relacionados à concentração de RNA viral não tiveram nenhum interferente que poderia dar alterações na interpretação do resultado.

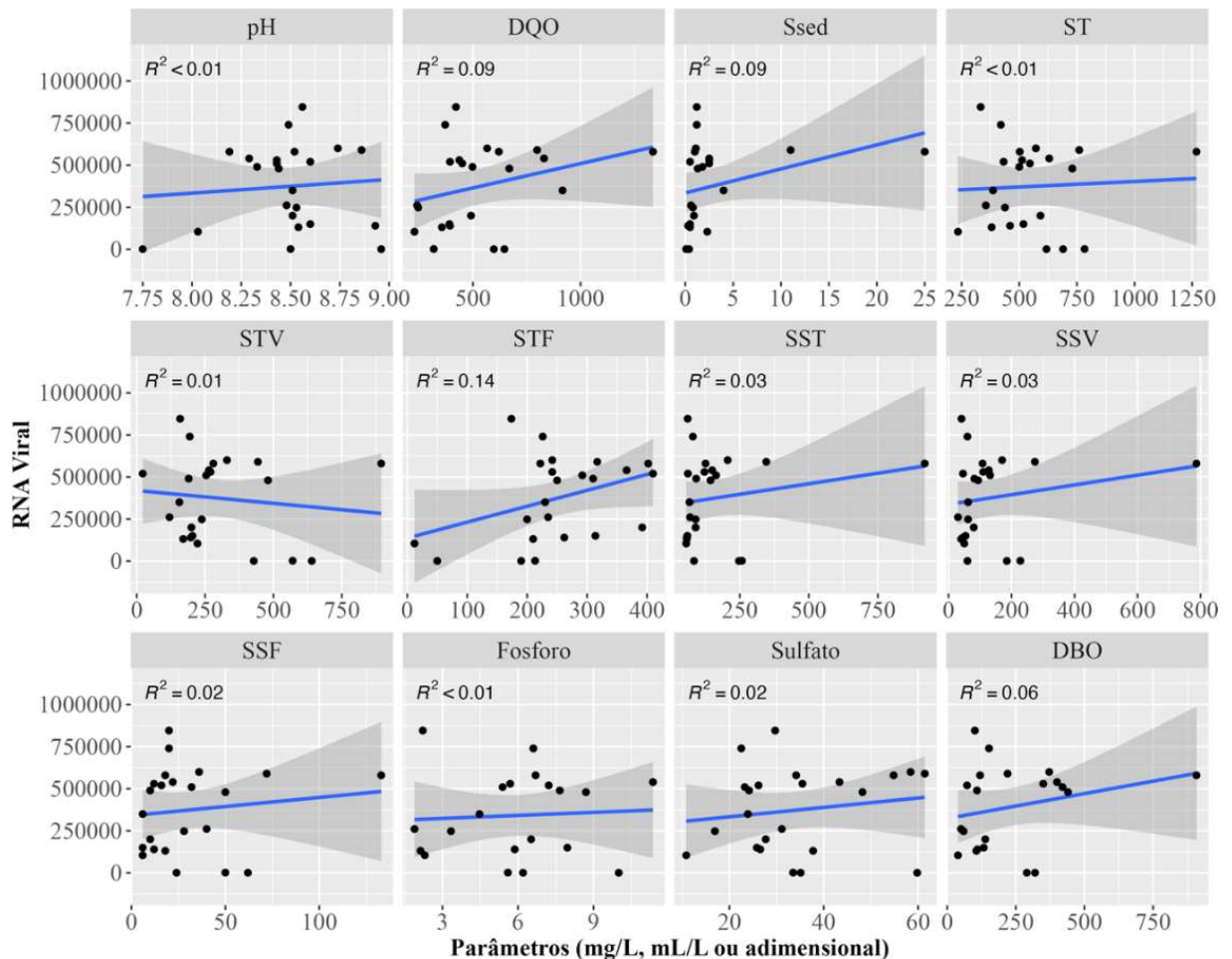
Mesmo assim, por ser considerado uma matriz complexa e instável, foi analisada a existência de correlação entre os parâmetros do efluente e a concentração dos fragmentos de RNA viral encontrados nele.

4.5 CORRELAÇÃO ENTRE AS CARACTERÍSTICAS DO EFLUENTE E A CONCENTRAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE RNA VIRAL

Além da análise acerca da concentração de RNA viral encontrada no esgoto bruto da Universidade Federal de Alfenas, buscou-se uma relação estatística entre parâmetros físico-químicos e microbiológicos com a concentração de RNA viral.

Primeiramente, realizou-se a análise de linearidade, por meio dos diagramas de dispersão, Figura 14.

Figura 14 – Diagramas de dispersão dos dados experimentais para análise de linearidade



Fonte: Autora (2024).

Pode-se observar que nenhum dos parâmetros apresentaram linearidade com a concentração dos fragmentos de RNA viral, visto que, os valores do coeficiente de determinação foram inferiores a 0,14. Vale enfatizar, que a ausência de linearidade não indica que não existe correlação entre as variáveis. Portanto, foram avaliados inicialmente a normalidade dos dados, apresentados na Tabela 9.

A maioria dos dados não se apresentaram normais, provavelmente devido ao número de amostras ser relativamente baixo. Nesses casos, é comum a ausência de normalidade, fazendo com que seja necessário o uso de testes não paramétricos para a avaliação estatística posterior. É importante ressaltar a relevância desse tipo de análise face a necessidade de verificação dos pressupostos de normalidade dos testes frequentemente utilizados.

A avaliação da presença de *outliers* confirmou a existência de dados experimentais discrepantes, cuja retirada dos dados é decisão do pesquisador. Nesse trabalho, optou-se por sua retirada considerando o intervalo interquartil (IQR), para que as análises de correlação fossem realizadas sem o efeito de dados extremos. Na Figura 15 são apresentados os gráficos *box-plot* dos dados experimentais com os *outliers* representados por pontos cheios.

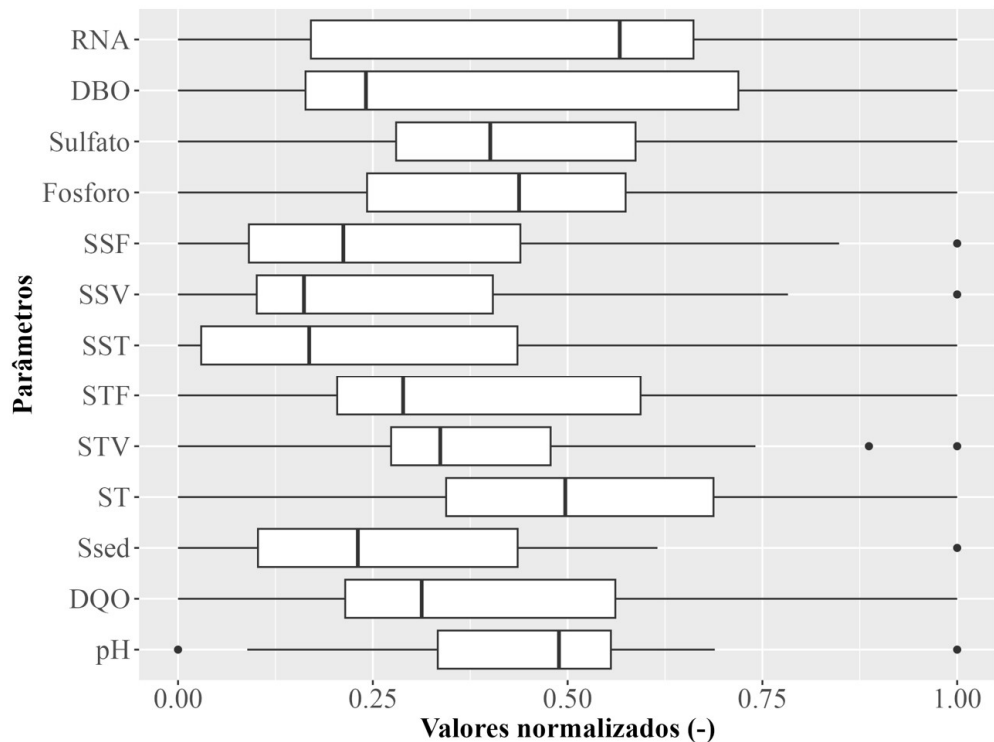
Tabela 9 – Normalidade dos dados experimentais

Parâmetro	Normalidade*
pH	Sim
DQO	Não
DBO	Não
ST	Não
STV	Não
STF	Sim
SST	Não
SSV	Não
SSF	Não
Sólidos Sedimentáveis	Não
Fósforo	Sim
Sulfato	Sim
RNA viral	Sim

Fonte: Autora (2024).

Notas: *Segundo Shapiro-Wilk com 95% de significância.

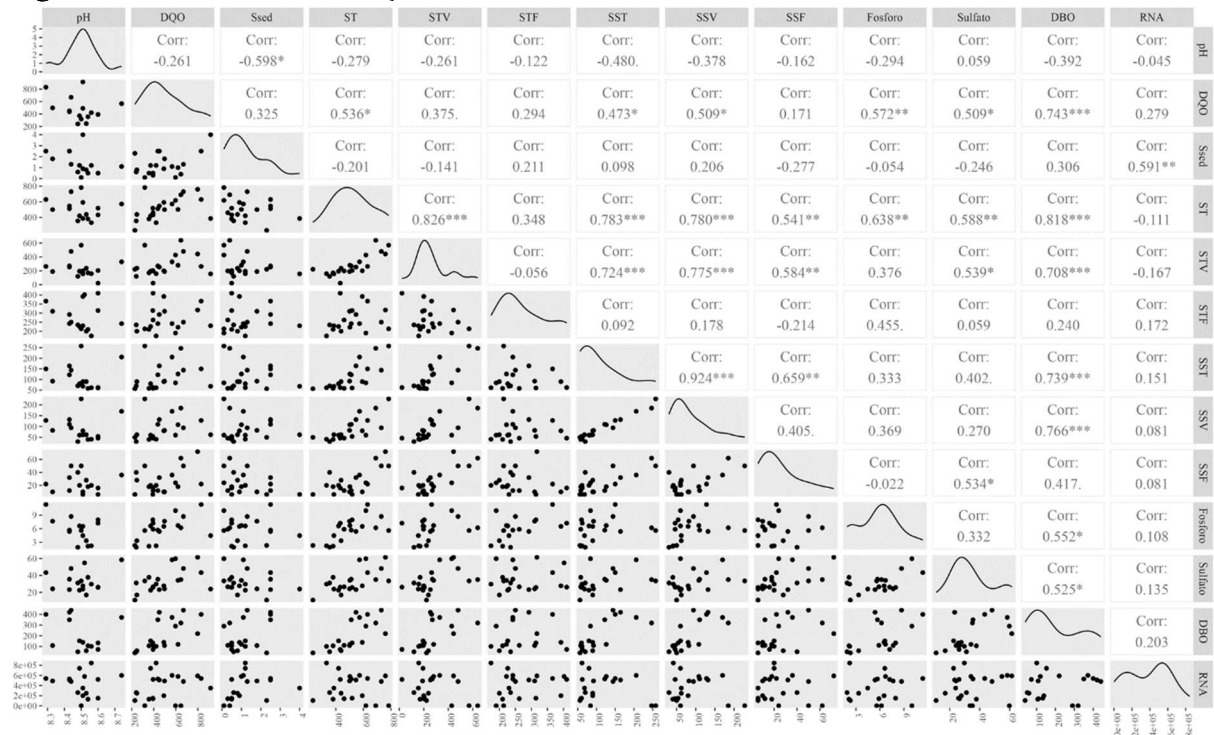
Figura 15 – *Box-plot* dos dados experimentais normalizados



Fonte: Autora (2024).

A análise de correlação do Spearman (Figura 16) mostrou elevadas correlações entre os parâmetros de esgoto. Isso indica que o estudo se utilizou de esgoto com características semelhantes aos esgotos sanitários encontrados nas cidades. Especificamente no que diz respeito à correlação com a concentração de RNA viral, os sólidos sedimentáveis apresentaram forte correlação, superior a 0,591, podendo indicar que os fragmentos de RNA viral estavam aderidos em partículas de fezes no esgoto sanitário. Um estudo verificou uma frequência maior de fragmentos de RNA viral em amostras de sólidos sedimentáveis quando comparado com o efluente líquido correspondente aos sólidos estudados, indicando que, sólidos sedimentáveis aderem uma maior carga viral, além de ser encontrado com maior frequência, foram encontrados em concentrações de 350 a 3100 vezes maiores (Graham *et al.*, 2020).

Figura 16 – Matriz de correlação das variáveis monitoradas no estudo



Fonte: Autora (2024).

Amoah *et al.* (2022), afirmam que o vírus assume uma estabilidade ótima em pH próximos ao neutro. Como pôde-se observar, no presente trabalho o pH permaneceu básico em todas as semanas analisadas, média de $8,49 \pm 0,27$. Não houve interferência desse parâmetro na concentração de RNA viral, ou seja, variaram de forma independente. Resultado convergente ao estudo de Lu *et al.* (2022), que não encontrou correlação entre o pH e a concentração de RNA de SARS-CoV-2 em suas análises, especificamente do gene N1, obtendo correlações de Spearman fracas.

O comportamento da DQO em relação a concentração de RNA viral é complexo, portanto, Amoah e seus colaboradores (2022), não observaram impacto da DQO na quantificação de RNA do SARS-CoV-2. Também não encontraram resultados significativos acerca da influência da concentração de sólidos totais na concentração de RNA. Em um estudo desenvolvido por Abreu *et al.* (2022), também não foi observada correlação forte entre a DQO e a concentração de RNA viral, da mesma forma que ocorreu com o pH e sólidos suspensos totais.

Pelo modo como ocorreu a amostragem, houve a exposição do poço de sucção a intempéries, principalmente às chuvas, durante as doze horas de coleta. Por isso, foi realizada a verificação da interferência da precipitação nos dias que ocorreram as coletas, obtida pelo Instituto Nacional de Meteorologia (INMET) e os dados de concentração do RNA viral. Esses

foram verificados pelo teste t, obtendo o valor de $p = 0,47$, sendo assim, não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre a concentração de RNA de SARS-CoV-2 e a chuva, dessa forma, a chuva não interferiu na concentração de RNA viral. Portanto, a diluição no esgoto não influenciou a concentração de RNA viral, tal afirmação acorda com o exposto por Gibas *et al.* (2021), que não verificou influência negativa de junções de águas e as diluições no esgoto.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O monitoramento do SARS-CoV-2 é uma ferramenta essencial para conter surtos da COVID-19, esse pode ocorrer tanto por testes clínicos quanto pela epidemiologia baseada em esgoto. A EBE se mostrou muito eficaz em inúmeros estudos realizados em esfera municipal, permitindo a observação precoce dos picos de casos. Pelo presente estudo, foi possível observar que o monitoramento nas universidades deveria ocorrer frequentemente, visto que é um ambiente que há contato entre os alunos dentro de um ambiente fechado, inviabilizando um distanciamento social adequado. Ao identificar a presença dos fragmentos de RNA viral em concentrações superiores às concentrações habituais, pode-se tomar medidas preventivas mais rigorosas para conter um possível pico dentro do *campus*.

O presente estudo apresentou amostras positivas para a presença de RNA do SARS-CoV-2 em todas as semanas analisadas, que compreendeu o primeiro e segundo semestre de 2023. Isso indica que houve a utilização da universidade por pessoas que estavam com a COVID-19 e excretando o RNA na rede de esgoto do *campus*. Além disso, foi possível identificar a concentração de RNA viral detectado, que iniciou as três primeiras semanas com valores entre $1,00 \times 10^2$ e $1,00 \times 10^3$ cópias de RNA/L, permaneceu com resultados na ordem de $1,00 \times 10^5$ cópias de RNA/L nas 20 semanas posteriormente analisadas.

Além da detecção e quantificação de fragmentos de RNA viral, realizou-se a caracterização do efluente gerado na Universidade Federal de Alfenas *campus* Poços de Caldas, e observou que suas características se assemelham aos parâmetros gerais determinados para esgoto doméstico, e obteve semelhança com algumas caracterizações de esgotos universitários.

Foi analisada a correlação entre a concentração de RNA viral com os parâmetros analisados no efluente, com o intuito de verificar biomarcadores para a presença dos fragmentos de RNA ou algum interferente. Os sólidos sedimentáveis apresentaram correlação forte com a concentração de RNA viral e o restante dos parâmetros não interferiu.

O presente estudo foi o primeiro do Brasil que analisou a presença de RNA de SARS-CoV-2 em efluentes universitários, e apesar de apresentar uma população contribuinte pequena, foi observado RNA viral em todas as semanas analisadas. Portanto, faz-se necessária a adoção de projetos que permitam a conscientização da população acadêmica quando detectado os fragmentos de RNA viral no efluente, visto que a detecção pode ser precoce e diminuir de forma significativa a quantidade de casos positivos em uma comunidade.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A epidemiologia baseada em esgoto é uma ferramenta abrangente, pois consegue monitorar inúmeras doenças, que podem ter seus vetores excretados por trato digestivo ou até mesmo por vias respiratórias na rede de esgoto local. O presente trabalho ficou limitado quanto a adoção de projetos que abordassem medidas para conter a disseminação da COVID-19 a partir da detecção do RNA viral no efluente da universidade, visto que os resultados da detecção e concentração de RNA viral não ocorreram de forma simultânea às coletas realizadas. Contudo, foi um trabalho pioneiro no âmbito universitário, que pode impulsionar outros trabalhos a adotarem políticas de prevenção para conter a disseminação de qualquer doença com potencial pandêmico, quando o vetor dessa for excretado na rede de esgoto. Essas políticas podem incluir a publicação de boletins informativos, por meio das redes sociais, sobre o *status* da concentração dos fragmentos de RNA do SARS-CoV-2 ou outra doença a ser monitorada no efluente da universidade, e panfletos de conscientização sobre a doença e sua prevenção quando for observado um aumento significativo na concentração.

REFERÊNCIAS

- ASGHAR, H. *et al.* Environmental Surveillance for Polioviruses in the Global Polio Eradication Initiative. **Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 210, n. 1, p. 294-303, 14 out. 2014.
- ABBASI, Amin *et al.* Can food matrices be considered as a potential carrier for COVID-19? **Infezioni In Medicina**, [S.L.], v. 30, n. 1, p. 59-72, 1 mar. 2022.
- ABREU, Mariana Aparecida de Freitas *et al.* Estudo do esgoto de um município do sul de Minas Gerais: correlação de variáveis físicas e químicas, casos de covid-19 e concentração do rna de sars-cov-2. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, [S.L.], v. 27, n. 5, p. 967-974, out. 2022.
- ABULSOUD, Ahmed I. *et al.* Mutations in SARS-CoV-2: insights on structure, variants, vaccines, and biomedical interventions. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S.L.], v. 157, p. 1-20, jan. 2023.
- AMOAHA, Isaac Dennis *et al.* Effect of selected wastewater characteristics on estimation of SARS-CoV-2 viral load in wastewater. **Environmental Research**, [S.L.], v. 203, p. 1-11, jan. 2022.
- APHA. 5220 Chemical Oxygen Demand (COD): 5220B. Open Reflux Method. In: APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23rd ed. Washington: American Public Health Association, 2017.
- APHA. 2540 Solids. In: APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23rd ed. Washington: American Public Health Association, 2017.
- APHA. 4500-SO₄²⁻ Sulfate. In: APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23rd ed. Washington: American Public Health Association, 2017.
- APHA. 4500-H⁺ pH value: 4500-H⁺ B. Electrometric Method. In: APHA. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 23rd ed. Washington: American Public Health Association, 2017.
- ASH, K. T. *et al.* SARS-CoV-2 raw wastewater surveillance from student residences on an urban university campus. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 14, n. 1, p. 1-9, 9 fev. 2023.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 12614**: Águas - Determinação da demanda bioquímica de oxigênio (DBO) - Método de incubação (20°C, cinco dias). Rio de Janeiro: ABNT, 1992.
- AUGUSTO, Matheus Ribeiro *et al.* Sampling strategies for wastewater surveillance: evaluating the variability of sars-cov-2 rna concentration in composite and grab samples. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, [S.L.], v. 10, n. 3, p. 1-10, jun. 2022.

BASAK, Mitali; MITRA, Shirsendu; BANDYOPADHYAY, Dipankar. Pathways to community transmission of COVID-19 due to rapid evaporation of respiratory virulets. **Journal Of Colloid And Interface Science**, [S.L.], v. 619, p. 229-245, ago. 2022.

BERTOLINO, Sueli M.; CARVALHO, Cornélio F.; AQUINO, Sérgio F. Caracterização e biodegradabilidade aeróbia e anaeróbia dos esgotos produzidos em campus universitário. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, [S.L.], v. 13, n. 3, p. 271-277, jul. 2008.

BETANCOURT, Walter Q. *et al.* COVID-19 containment on a college campus via wastewater-based epidemiology, targeted clinical testing and an intervention. **Science Of The Total Environment**, Tucson, v. 779, p. 1-7, jul. 2021.

BIBBY, Kyle *et al.* Making waves: plausible lead time for wastewater based epidemiology as an early warning system for covid-19. **Water Research**, [S.L.], v. 202, p. 1-5, set. 2021.

BIORENDER. 2023. Disponível em: <<https://app.biorender.com/>> Acesso em: 23 maio 2023.

BRASIL. Fundação Nacional da Saúde. **Manual de saneamento**. 2004. Disponível em: <https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/funasa/capitulo_3.pdf> Acesso em: 19 fev. 2024.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Comirnaty bivalente (Pfizer)**. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/paf/coronavirus/vacinas/comirnaty-bivalente-pfizer>> Acesso em: 23 maio 2023

BRASIL. Ministério da Saúde. **Diagnóstico: saiba como é feito o diagnóstico dos casos de COVID-19 no Brasil**. 2023. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/coronavirus/diagnostico>> Acesso em: 25 maio 2023.

BUENO, Rodrigo de Freitas *et al.* Wastewater-based epidemiology: a brazilian sars-cov-2 surveillance experience. **Journal Of Environmental Chemical Engineering**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 1-9, out. 2022.

BUSSAB, W.O.; MORETTIN, P.A. **Estatística Básica**. 10^a ed. São Paulo: SaraivaUni, 2023. ePUB.

CABRAL, Aline Diniz *et al.* Padronização de método de concentração e extração de ácidos nucleicos em amostras de esgoto sanitário: uma ferramenta de baixo custo para ser utilizada na vigilância epidemiológica de sars-cov-2. **Engenharia Sanitária e Ambiental**, [S.L.] v. 26, n. 6, p. 1043-1049, dez. 2021.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **CDC 2019-Novel Coronavirus (2019-nCoV) Real-Time RT-PCR Diagnostic Panel**. 2023. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/134922/download>> Acesso em: 15 maio 2023.

CHERNICHARO, Carlos Augusto de Lemos *et al.* Monitoramento do esgoto como ferramenta de vigilância epidemiológica para controle da COVID-19: estudo de caso na cidade de belo horizonte. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 26, n. 4, p. 691-699, ago. 2021.

- CHOI, Phil M. *et al.* Wastewater-based epidemiology biomarkers: past, present and future. **Trac Trends In Analytical Chemistry**. v. 105, p. 453-469, ago. 2018.
- CHOWDHURY, S.M.K. *et al.* Modeling the SARS-CoV-2 parallel transmission dynamics: asymptomatic and symptomatic pathways. **Computers In Biology And Medicine**, [S.L.], v. 143, p. 1-11, abr. 2022.
- CIOTTI, Marco *et al.* The COVID-19 pandemic. **Critical Reviews In Clinical Laboratory Sciences**, [S.L.], v. 57, n. 6, p. 365-388, 9 jul. 2020.
- CLARO, Ieda Carolina Mantovani *et al.* Long-term monitoring of SARS-COV-2 RNA in wastewater in Brazil: a more responsive and economical approach. **Water Research**, [S.L.], v. 203, p. 1-12, set. 2021.
- COCHERIE, Théophile *et al.* Epidemiology and Characteristics of SARS-CoV-2 Variants of Concern: the impacts of the spike mutations. **Microorganisms**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 30, 22 dez. 2022.
- CORCHIS-SCOTT, Ryland *et al.* Averting an Outbreak of SARS-CoV-2 in a University Residence Hall through Wastewater Surveillance. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 9, n. 2, p. 1-12, 31 out. 2021.
- FONGARO, Gislaine *et al.* The presence of SARS-CoV-2 RNA in human sewage in Santa Catarina, Brazil, November 2019. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 778, p. 1-4, jul. 2021.
- FAN, Yi *et al.* Bat Coronaviruses in China. **Viruses**, v. 11, n. 3, p. 210, 2 mar. 2019.
- GHASEMI, A.; ZAHEDIASL S. Normality Tests for Statistical Analysis: A Guide for Non-Statisticians. *International Journal of Endocrinology* (2012) 10(2):486–489
- GIBAS, Cynthia *et al.* Implementing building-level SARS-CoV-2 wastewater surveillance on a university campus. **Science Of The Total Environment**, v. 782, p. 1-9, ago. 2021.
- GIGLIO, Osvalda de *et al.* Potential Use of Untreated Wastewater for Assessing COVID-19 Trends in Southern Italy. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.] v. 18, n. 19, p. 10278, 29 set. 2021.
- GOGOI, Gayatri *et al.* An interpretative review of the wastewater-based surveillance of the SARS-CoV-2: where do we stand on its presence and concern?. **Frontiers In Microbiology**, [S.L.], v. 15, p. 1-12, 22 jan. 2024.
- GRAHAM, Katherine E. *et al.* SARS-CoV-2 RNA in Wastewater Settled Solids Is Associated with COVID-19 Cases in a Large Urban Sewershed. **Environmental Science & Technology**, [S.L.], v. 55, n. 1, p. 488-498, 7 dez. 2020.
- GRIMAH, Khaoula *et al.* Physicochemical characterization of university campus' wastewater for internal treatment system installation (Casablanca, Morocco). **Environmental Research And Technology**, Casablanca, p. 1-14, 13 nov. 2023.

HART, Olga E.; HALDEN, Rolf U.. Computational analysis of SARS-CoV-2/COVID-19 surveillance by wastewater-based epidemiology locally and globally: feasibility, economy, opportunities and challenges. **Science Of The Total Environment**, v. 730, p. 138875, ago. 2020.

HASAN, Shadi W. *et al.* Detection and quantification of SARS-CoV-2 RNA in wastewater and treated effluents: surveillance of covid-19 epidemic in the united arab emirates. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 764, p. 1-10, abr. 2021.

HAUSE, Anne M. *et al.* Safety Monitoring of Bivalent COVID-19 mRNA Vaccine Booster Doses Among Persons Aged ≥ 12 Years — United States, August 31–October 23, 2022. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, United States, v. 71, n. 44, p. 1401-1406, 04 nov. 2022.

HE, Yuting *et al.* Treatment for domestic wastewater from university dorms using a hybrid constructed wetland at pilot scale. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 25, n. 9, p. 8532-8541, 8 jan. 2018.

HONG, Pei-Ying *et al.* Estimating the minimum number of SARS-CoV-2 infected cases needed to detect viral RNA in wastewater: to what extent of the outbreak can surveillance of wastewater tell us?. **Environmental Research**, [S.L.], v. 195, p. 1-8, abr. 2021.

HOKAJÄRVI, Anna-Maria *et al.* The detection and stability of the SARS-CoV-2 RNA biomarkers in wastewater influent in Helsinki, Finland. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 770, p. 1-7, maio 2021.

HUANG, Jianping *et al.* Water Transmission Increases the Intensity of COVID-19 Outbreaks. **Frontiers In Public Health**, [S.L.], v. 10, p. 1-10, 25 maio 2022.

IACOB, Daniela *et al.* First Neonates with Vertical Transmission of SARS-CoV-2 Infection in Late Pregnancy in West Part of Romania: case series. **Diagnostics**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 1-10, 9 jul. 2022.

Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT). **Rede Monitoramento Covid Esgotos**. 2024. Disponível em: <<https://etes-sustentaveis.org/project/rede-monitoramento-covid-esgotos/>> Acesso em: 24 abr. 2024.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **ICTV Taxonomy history: Sarbecovirus**. 2019. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=202106129> Acesso em: 29 jul. 2022.

KILARU, Pruthvi *et al.* Wastewater Surveillance for Infectious Disease: a systematic review. **American Journal Of Epidemiology**, [S.L.], v. 192, n. 2, p. 305-322, 13 out. 2022.

KASMI, Yassine *et al.* Coronaviridae: 100,000 years of emergence and reemergence. **Emerging And Reemerging Viral Pathogens**, p. 127-149, 2020.

KARTHIKEYAN, Smruthi *et al.* Rapid, Large-Scale Wastewater Surveillance and Automated Reporting System Enable Early Detection of Nearly 85% of COVID-19 Cases on a University Campus. **Msystems**, [S.L.], v. 6, n. 4, p. 1-10, 31 ago. 2021.

- KAZENELSON, Jacob *et al.* Detection of SARS-CoV-2 RNA in wastewater from an enclosed college campus serves as an early warning surveillance system. **Plos One**, [S.L.], v. 18, n. 7, p. 1-15, 20 jul. 2023.
- KO, Wen-Chien *et al.* Arguments in favour of remdesivir for treating SARS-CoV-2 infections. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, [S.L.], v. 55, n. 4, p. 105933, abr. 2020.
- KUMAR, Swatantra *et al.* Morphology, Genome Organization, Replication, and Pathogenesis of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Medical Virology: From Pathogenesis to Disease Control**, [S.L.], p. 23-31, 2020.
- LAI, Michael M.C.; CAVANAGH, David. The Molecular Biology of Coronaviruses. **Advances in Virus Research**, p. 1-100, 1997.
- LAROSA, Giuseppina *et al.* First detection of SARS-CoV-2 in untreated wastewaters in Italy. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 736, p. 1-5, set. 2020.
- LI, Xuan *et al.* SARS-CoV-2 shedding sources in wastewater and implications for wastewater-based epidemiology. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 432, p. 1-10, jun. 2022.
- LLANOS, Rosa de *et al.* Monitoring the evolution of SARS-CoV-2 on a Spanish university campus through wastewater analysis: a pilot project for the reopening strategy. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 845, p. 157370, nov. 2022.
- LORENZO, Maria; PICÓ, Yolanda. Wastewater-based epidemiology: current status and future prospects. **Current Opinion In Environmental Science & Health**, v. 9, p. 77-84, jun. 2019.
- LU, Emily *et al.* Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 in dormitories as a part of comprehensive university campus COVID-19 monitoring. **Environmental Research**, [S.L.], v. 212, p. 1-12, set. 2022.
- MACHADO, Bruna *et al.* The Main Molecular and Serological Methods for Diagnosing COVID-19: an overview based on the literature. **Viruses**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 1-36, 29 dez. 2020.
- MAGNO, Laio *et al.* Desafios e propostas para ampliação da testagem e diagnóstico para COVID-19 no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, [S.L.], v. 25, n. 9, p. 3355-3364, set. 2020.
- MANSOURABADI, Amir Hossein *et al.* Serological and Molecular Tests for COVID-19: a recent update. **Iranian Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 18, n. 1, p. 13-33, mar. 2021.
- MEDEMA, Gertjan *et al.* Implementation of environmental surveillance for SARS-CoV-2 virus to support public health decisions: opportunities and challenges. **Current Opinion In Environmental Science & Health**, v. 17, p. 49-71, out. 2020a.

- MEDEMA, Gertjan *et al.* Presence of SARS-Coronavirus-2 RNA in Sewage and Correlation with Reported COVID-19 Prevalence in the Early Stage of the Epidemic in The Netherlands. **Environmental Science & Technology Letters**, [S.L.], v. 7, n. 7, p. 511-516, 20 maio 2020b.
- MENDES, Geovana *et al.* Monitoramento Da Carga Viral De SARS-CoV-2 Em Águas Residuais Na Cidade de Goiânia: epidemiologia baseada em esgoto e um sistema de alerta precoce para COVID-19. **Química Nova**, [S.L.], v. 45, n. 10, p. 1197-1204, 19 ago. 2022.
- MENEZES, Leda Carolina Carvalho. **Caracterização de efluente gerado no campus Poços de Caldas da Universidade Federal de Alfenas**. 2017. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência e Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Alfenas, Poços de Caldas, 2017.
- MLEJNKOVA, Hana *et al.* Preliminary Study of Sars-Cov-2 Occurrence in Wastewater in the Czech Republic. **International Journal Of Environmental Research And Public Health**, [S.L.], v. 17, n. 15, p. 1-9, 30 jul. 2020.
- MOHAPATRA, Sanjeeb *et al.* Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 and chemical markers in campus dormitories in an evolving COVID – 19 pandemic. **Journal Of Hazardous Materials**, [S.L.], v. 446, p. 1-14, mar. 2023.
- MUTTAMARA, Samorn. Wastewater characteristics. **Resources, Conservation and Recycling**, Bangkok, v. 16, p. 145-159, 1996.
- NING, Tingting *et al.* Potential intestinal infection and faecal-oral transmission of human coronaviruses. **Reviews In Medical Virology**, [S.L.], v. 32, n. 6, p. 1-13, 18 maio 2022.
- NOORIMOTLAGH, Zahra *et al.* A systematic review of possible airborne transmission of the COVID-19 virus (SARS-CoV-2) in the indoor air environment. **Environmental Research**, [S.L.], v. 193, p. 1-6, fev. 2021.
- PAPAEVANGELOU, Vassiliki; GIKAS, Georgios D.; TSIHRINTZIS, Vassilios A.. Effect of Operational and Design Parameters on Performance of Pilot-Scale Vertical Flow Constructed Wetlands Treating University Campus Wastewater. **Water Resources Management**, [S.L.], v. 30, n. 15, p. 5875-5899, 31 ago. 2016.
- PAUL, John R.; TRASK, James D.; GARD, Sven. II. POLIOMYELITIC VIRUS IN URBAN SEWAGE. **Journal Of Experimental Medicine**, [S.L.], v. 71, n. 6, p. 765-777, 1 jun. 1940.
- POÇOS DE CALDAS. Prefeitura Municipal de Poços de Caldas. **Painel COVID-19**. 2023. Disponível em: <<https://pocosdecaldas.mg.gov.br/covid-19/>> Acesso em: 29 abr. 2024.
- POSIT TEAM. **RStudio**: Integrated Development Environment for R. 2024. Disponível em: <<http://www.posit.co/>> Acesso em: 23 abr. 2024.
- PRASEK, Sarah M. *et al.* Population level SARS-CoV-2 fecal shedding rates determined via wastewater-based epidemiology. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 838, p. 1-8, set. 2022.

R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing.** 2023. Disponível em: <<https://www.R-project.org/>> Acesso em: 23 abr. 2024.

RODRIGUEZ-MORALES, Alfonso J. *et al.* COVID-19 in Latin America: the implications of the first confirmed case in Brazil. **Travel Medicine And Infectious Disease**, [S.L.], v. 35, p. 101613, maio 2020.

ROY, Vicky *et al.* SARS-CoV-2-specific ELISA development. **Journal Of Immunological Methods**, [S.L.], v. 484-485, p. 1-12, set. 2020.

SCOTT, Laura C. *et al.* Targeted wastewater surveillance of SARS-CoV-2 on a university campus for COVID-19 outbreak detection and mitigation. **Environmental Research**, [S.L.], v. 200, p. 1-10, set. 2021.

SCHUSSMAN, Melissa K.; MCLELLAN, Sandra L.. Effect of Time and Temperature on SARS-CoV-2 in Municipal Wastewater Conveyance Systems. **Water**, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 1-15, 23 abr. 2022.

SETHURAMAN, Nandini; JEREMIAH, Sundararaj Stanleyraj; RYO, Akihide. Interpreting Diagnostic Tests for SARS-CoV-2. *Jama*, [S.L.], v. 323, n. 22, p. 1-3, 9 jun. 2020.

SHARABY, Y. *et al.* Whole campus wastewater surveillance of SARS-CoV-2 for COVID-19 outbreak management. **Water Science And Technology**, [S.L.], v. 87, n. 4, p. 910-923, 2 fev. 2023.

SHAPIRO, S.S.; WILK, M.B. An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika*. 1965; 52(3 and 4):591.

SHEREEN, Muhammad Adnan *et al.* COVID-19 infection: emergence, transmission, and characteristics of human coronaviruses. **Journal Of Advanced Research**, [S.L.], v. 24, p. 91-98, jul. 2020.

SOH, Jun Hui; CHAN, Hsi-Min; YING, Jackie Y.. Strategies for developing sensitive and specific nanoparticle-based lateral flow assays as point-of-care diagnostic device. **Nano Today**, [S.L.], v. 30, p. 1-17, fev. 2020.

SONG, Zhiquan *et al.* Detection of SARS-CoV-2 in Wastewater: community variability, temporal dynamics, and genotype diversity. **Acs Es&T Water**, [S.L.], v. 1, n. 8, p. 1816-1825, 29 jul. 2021.

STRICKLAND, John Douglas Hipwell; PARSONS, Timothy Richard. **A practical handbook of seawater analysis**. 2. ed. Ottawa: Fisheries Research Board Of Canada, 1972.

TIWARI, Ananda *et al.* Persistence and occurrence of SARS-CoV-2 in water and wastewater environments: a review of the current literature. **Environmental Science And Pollution Research**, [S.L.], v. 29, n. 57, p. 85658-85668, 15 out. 2021.

TRAN, Hai Nguyen *et al.* SARS-CoV-2 coronavirus in water and wastewater: a critical review about presence and concern. **Environmental Research**, [S.L.], v. 193, p. 1-12, fev. 2021.

Universidade Federal De Alfenas (UNIFAL). **Boletim INDCOVID**. 2022. Disponível em: <<https://www.unifal-mg.edu.br/portal/noticias/boletim-indcovid/>> Acesso em: 29 abr. 2024.

UTKU, Aylin Çalica *et al.* Main symptoms in patients presenting in the COVID-19 period. **Scottish Medical Journal**, [S.L.], v. 65, n. 4, p. 127-132, 17 ago. 2020.
VALDERRAMA, Jorge C. The simultaneous analysis of total nitrogen and total phosphorus in natural waters. **Marine Chemistry**, Gotemburgo, v. 10, n. 2, p. 109-122, jan. 1981.

VOGELS, Chantal B. F. *et al.* Analytical sensitivity and efficiency comparisons of SARS-CoV-2 RT-qPCR primer-probe sets. **Nature Microbiology**, [S.L.], v. 5, n. 10, p. 1299-1305, 10 jul. 2020.

VON SPERLING, Marcos. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 4. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2014. 472 p.

WENG, Lin-Man; SU, Xuan; WANG, Xue-Qiang. Pain Symptoms in Patients with Coronavirus Disease (COVID-19): a literature review. **Journal Of Pain Research**, [S.L.], v. 14, p. 147-159, jan. 2021.

WILSON, Erica *et al.* Multiple COVID-19 Clusters on a University Campus – North Carolina, August 2020. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, United States, v. 69, n. 39, p. 1416-1418, 02 out. 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO COVID-19 Dashboard**: Number of COVID-19 deaths reported to WHO. 2024. Disponível em: <<https://data.who.int/dashboards/covid19/deaths?n=c>> Acesso em: 27 fev. 2024.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diagnostic testing for SARS-CoV-2**. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/publications/i/item/diagnostic-testing-for-sars-cov-2>> Acesso em: 24 maio 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Novel coronavirus**: China. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2020-DON233>> Acesso em: 20 jul. 2022.

WU, Fuqing *et al.* Wastewater surveillance of SARS-CoV-2 across 40 U.S. states from February to June 2020. **Water Research**, [S.L.], v. 202, p. 1-7, set. 2021.

WU, Yongjian *et al.* Prolonged presence of SARS-CoV-2 viral RNA in faecal samples. **The Lancet Gastroenterology & Hepatology**, [S.L.], v. 5, n. 5, p. 434-435, maio 2020.

XU, Jiang *et al.* Rapid Antigen Diagnostics as Frontline Testing in the COVID-19 Pandemic. **Small Science**, [S.L.], v. 2, n. 8, p. 1-14, 5 jul. 2022.

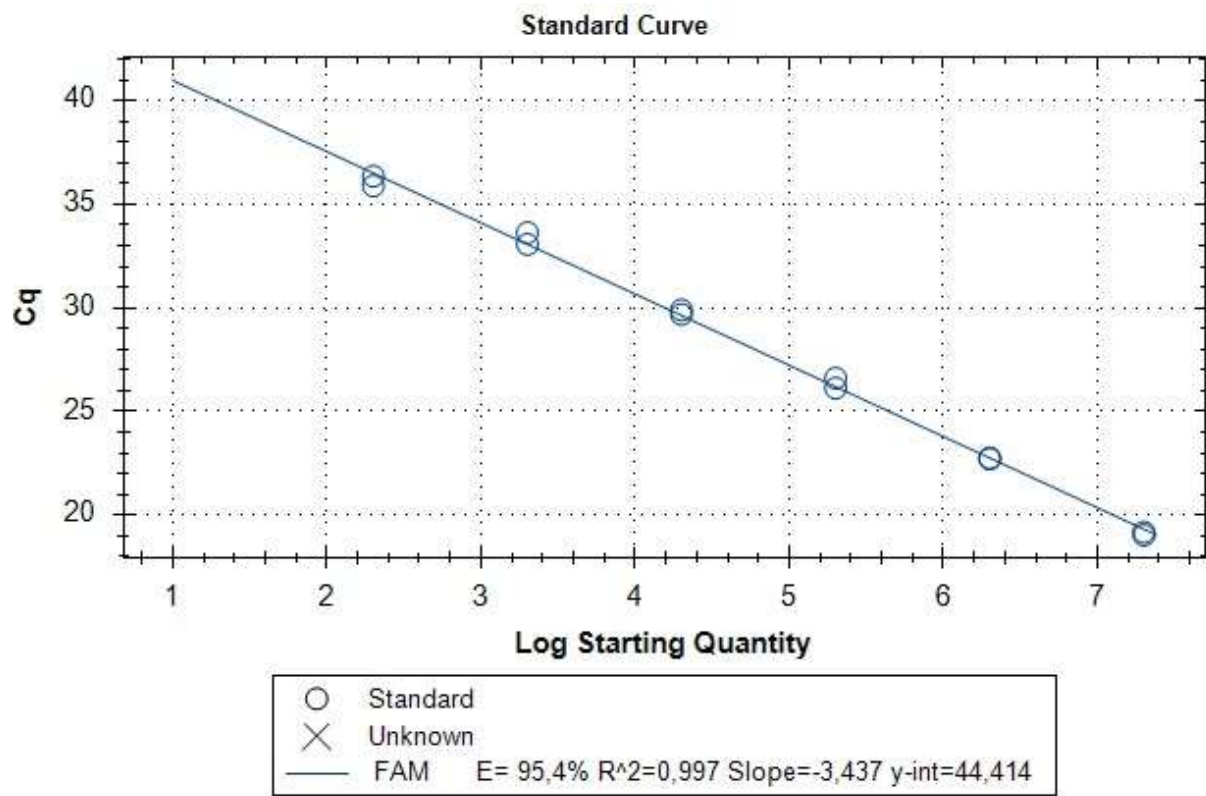
YÜCE, Meral; FILIZTEKIN, Elif; ÖZKAYA, Korin Gasia. COVID-19 diagnosis —A review of current methods. **Biosensors And Bioelectronics**, [S.L.], v. 172, p. 1-15, jan. 2021.

ZHU, Yifan *et al.* Early warning of COVID-19 via wastewater-based epidemiology: potential and bottlenecks. **Science Of The Total Environment**, [S.L.], v. 767, p. 1-9, maio 2021.

APÊNDICE A – Caracterização dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos do esgoto

	pH	DQO (mg/L)	Sólidos Sedimentáveis (mL/L)	ST (mg/L)	STV (mg/L)	STF (mg/L)	SST (mg/L)	SSV (mg/L)	SSF (mg/L)	Fósforo (mg/L)	Sulfato (mg/L)	DBO (mg/L)
C.1	8,96	597,00	0,10	618,00	428,00	190,00	84,00	60,00	24,00	10,00	59,80	290,00
C.2	8,50	318,00	0,10	783,30	570,00	213,30	258,00	228,00	50,00	5,60	33,50	-
C.3	7,75	646,00	0,40	690,00	640,00	50,00	247,00	185,00	62,00	6,20	35,10	320,00
C.4	8,44	669,00	1,30	730,00	480,00	250,00	144,00	94,00	50,00	8,70	48,20	440,00
C.5	8,86	798,00	11,00	760,00	443,00	317,00	346,00	274,00	72,00	-	61,40	220,00
C.6	8,52	1336,00	25,00	1269,00	894,00	402,00	920,00	787,00	133,00	-	54,80	908,10
C.7	8,74	566,00	1,10	572,00	330,00	242,00	206,00	170,00	36,00	-	58,40	371,80
C.8	8,29	830,17	2,50	630,00	264,00	366,00	150,00	128,00	22,00	11,36	43,33	400,00
C.9	8,43	436,83	2,50	512,00	270,00	242,00	122,00	110,00	12,00	5,69	35,48	350,00
C.10	8,43	450,17	2,50	546,00	254,00	292,00	164,00	132,00	32,00	5,39	23,25	420,00
C.11	8,19	620,17	1,00	502,00	280,00	222,00	126,00	108,00	18,00	6,70	34,14	120,00
C.12	8,51	916,00	4,00	386,00	156,00	230,00	68,00	62,00	6,00	4,47	23,92	0,00
C.13	8,49	371,00	1,20	420,00	194,00	226,00	80,00	60,00	20,00	6,61	22,52	152,51
C.14	8,33	497,67	1,80	500,00	190,00	310,00	92,00	82,00	10,00	7,66	24,17	108,56
C.15	8,60	393,50	0,50	432,00	22,00	410,00	62,00	46,00	16,00	7,22	26,17	72,43
C.16	8,60	391,00	0,50	518,00	204,00	314,00	60,00	54,00	6,00	7,96	25,81	133,20
C.17	8,51	491,00	0,90	592,00	200,00	392,00	90,00	80,00	10,00	6,52	27,69	138,84
C.18	8,93	393,50	0,30	460,00	198,00	262,00	58,00	46,00	12,00	5,87	26,54	110,18
C.19	8,53	246,00	0,80	438,00	238,00	200,00	90,00	62,00	28,00	3,34	16,92	59,75
C.20	8,03	228,50	2,30	234,00	222,00	12,00	56,00	50,00	6,00	2,30	10,84	39,42
C.21	8,54	356,00	0,50	380,00	170,00	210,00	58,00	40,00	18,00	2,13	37,73	106,26
C.22	8,48	241,00	0,60	355,00	120,00	235,00	70,00	30,00	40,00	1,89	31,10	50,54
C.23	8,56	421,00	1,20	332,50	158,75	173,75	61,25	41,25	20,00	2,22	29,70	101,02

Fonte: Autora (2023).

ANEXO A – Curva padrão de N1 para quantificação das amostras

ANEXO B – Curva padrão de N2 para quantificação das amostras